

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
MANON LEBEL**

**RÔLE DES PROTÉINES RESPONSABLES DU MAINTIEN DU
CYTOSQUELETTE NEURONAL DANS LA MALADIE DE PARKINSON
ET LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA**

MAI 2010

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES (Ph. D.)

Programme offert à l'Université du Québec à Trois-Rivières

RÔLE DES PROTÉINES RESPONSABLES DU MAINTIEN DU CYTOSQUELETTE NEURONAL
DANS LA MALADIE DE PARKINSON ET LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA

PAR

MANON LEBEL

M. Michel Cyr, directeur de recherche	Université du Québec à Trois-Rivières
---------------------------------------	---------------------------------------

Mme Maria-Grazia Martinoli, présidente du jury	Université du Québec à Trois-Rivières
--	---------------------------------------

Mme Céline Van Themsche, évaluatrice	Université du Québec à Trois-Rivières
--------------------------------------	---------------------------------------

Mme Thérèse Di Paolo, évaluatrice externe	Université Laval
---	------------------

Thèse soutenue le 07/05/2010

AVANT-PROPOS

La maladie de Parkinson et les complications motrices associées au traitement à la L-DOPA ont suscité mon intérêt dès mon arrivée dans le laboratoire de neuropharmacologie moléculaire. Quels sont les changements moléculaires se produisant dans le cerveau faisant en sorte qu'un traitement améliorant grandement la qualité de vie des patients parkinsoniens, devient à long terme, l'instigateur de mouvements moteurs involontaires très invalidants? Trouver une parcelle de réponse à cette question fût mon *alma mater* tout au long de mes études doctorales et ma quête se poursuit.

Cette passion pour la recherche je la dois à mon directeur de recherche, Michel Cyr qui, par son enthousiasme et son dynamisme, a su m'insuffler son intérêt pour la recherche dans le domaine des troubles du mouvement. Grâce à sa générosité et la confiance qu'il avait en moi, j'ai pu participer à plusieurs conférences internationales, ce qui m'a permis de rencontrer les plus grands chercheurs de ce monde et d'élargir mes horizons. Ce n'était pas toujours facile, certes, mais cette expérience a fait de moi une personne meilleure et grandie. Je te remercie du fond du cœur Michel, pour ta patience et ta persévérance ainsi que pour ton amitié, tu as été un mentor hors pair!

Bien évidemment, je ne pourrais passer sous silence la présence de mes collègues de laboratoire et leur bonne humeur. Ils ont toujours été là pour célébrer les victoires mais également essayer les revers. Sans eux, le chemin aurait été beaucoup plus ardu! Merci à tous ceux qui ont collaboré, de près ou de loin, à la réalisation de mes travaux de recherche et à ceux qui ont rendu si agréable mon passage dans la vie d'étudiante graduée, votre présence a été des plus appréciée. Un merci tout spécial également aux membres de mon jury de thèse, votre travail est très apprécié. En terminant, je tiens évidemment à remercier ma famille et mon conjoint, sans qui cette partie de ma vie aurait été

beaucoup plus difficile. Merci d'avoir servi de confidents, de motivateurs, de conseillers et de guides.

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est caractérisée par la dégénérescence sévère des cellules du cerveau produisant la dopamine, un neurotransmetteur jouant un rôle clé dans le contrôle du mouvement moteur. La diminution importante des niveaux de dopamine ainsi provoquée explique l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie. La L-DOPA, se transformant en dopamine dans le cerveau, est le médicament de choix utilisé pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. Toutefois, son utilisation à long terme est associée à l'apparition de mouvements moteurs involontaires appelés dyskinésies. La L-DOPA produit son effet en normalisant les niveaux de dopamine et est donc associée à une augmentation importante des niveaux de ce neurotransmetteur dans le cerveau. Certaines évidences de la littérature suggèrent que le fait d'augmenter les niveaux de dopamine dans le cerveau, soit par des moyens pharmacologiques ou génétiques, provoque des changements dans l'organisation structurale des neurones. Le but de ce travail de recherche est d'investiguer la possibilité que la maladie de Parkinson et les dyskinésies induites par la L-DOPA puissent être associées à des modifications dans les protéines affectant la structure du cytosquelette neuronal et pouvant mener à des changements dans la plasticité synaptique. Nous avons étudié les effets de la stimulation des récepteurs dopaminergiques *in vitro*, à l'aide de cellules SK-N-MC, *ex vivo* en utilisant des tranches fraîches de striatum de rats et *in vivo*, via un modèle de rat hémiparkinsonien traité à long terme avec la L-DOPA. Ces études nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, un lien direct entre l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 et des modifications de la protéine tau, une des principales protéines associées à la stabilisation des microtubules présente au niveau du cytosquelette des neurones. De plus, nous avons identifié les déterminants moléculaires et les voies de signalisation intracellulaires associées à ce phénomène. Des études *in vivo*, chez le rat, nous ont permis de mettre en évidence, pour la première

fois, le rôle de la protéine tau dans la maladie de Parkinson et l'émergence des mouvements moteurs involontaires induits par la L-DOPA. Nous avons également démontré que le mode d'administration de la L-DOPA ainsi que l'activation de la protéine kinase A (PKA), protéine centrale au système de neurotransmission dopaminergique, jouaient un rôle clé dans l'émergence des complications motrices. Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires permettant une meilleure compréhension des processus impliqués dans la maladie de Parkinson et l'émergence des troubles moteurs associés à la dopathérapie.

Mots clé : Maladie de Parkinson, dyskinésies, dopamine, tau, PKA, Cdk5, GSK3, L-DOPA, striatum, ganglions de la base.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xvii
 PARTIE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 La dopamine	1
1.1.1 Biosynthèse et métabolisme de la dopamine	1
1.1.2 Rôles centraux et périphériques de la dopamine	3
1.1.3 Principales voies dopaminergiques centrales	4
1.2 Les récepteurs dopaminergiques	5
1.2.1 Localisation des récepteurs D1-like	6
1.2.2 Localisation des récepteurs D2-like	7
1.2.3 Signalisation des récepteurs dopaminergiques D1-like.....	7
1.2.4 Signalisation des récepteurs dopaminergiques D2-like.....	10
1.3 La dopamine et le contrôle des mouvements moteurs volontaire	11
1.3.1 Organisation fonctionnelle des ganglions de la base	12
1.3.2 Les voies directes et indirectes	14

CHAPITRE 2	CONSÉQUENCE D'UN DÉRÈGLEMENT DE LA TRANSMISSION DOPAMINERGIQUE DANS LE CERVEAU	17
2.1	La neurodégénérescence associée à des dysfonctions de la transmission dopaminergique.....	18
2.1.1	Mécanismes moléculaires sous-jacents à la neurodégénérescence induite par la dopamine	18
2.1.2	Implication de la signalisation des récepteurs dopaminergiques dans la dégénérescence des neurones du striatum.....	18
2.2	Dysfonctions de la transmission dopaminergique et maladie de Parkinson	22
2.2.1	Étiopathologie de la maladie de Parkinson.	22
2.2.2	Physiopathologie de la maladie de Parkinson.....	25
2.2.3	Les symptômes associés à la maladie de Parkinson	27
2.2.3.1	La triade de symptômes moteurs	27
2.2.3.2	Autres symptômes de la maladie de Parkinson.	30
2.2.4	Traitements actuels de la maladie de Parkinson.....	32
2.2.4.1	La 3,4-dihydroxyphénylalanine ou L-DOPA	33
2.2.4.2	Les agonistes dopaminergiques.....	36
2.2.4.3	Les inhibiteurs de la monoamine oxydase.	38
2.2.4.4	L'amantadine.....	38
2.2.4.5	Les anticholinergiques	39
2.2.4.6	Perspectives futures.....	40
2.3	Dysfonctions de la transmission dopaminergique et les complications motrices de la dopathérapie.	41
2.3.1	Les fluctuations motrices.....	42
2.3.2	Les dyskinésies induites par la L-DOPA.	44

2.3.2.1	Physiopathologie des dyskinésies induites par la L-DOPA.....	45
2.3.2.2	Implication de la voie striato-nigrale dans l'induction des dyskinésies induites par la L-DOPA.	48
CHAPITRE 3	LES MODÈLES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON	53
3.1	Les modèles basés sur l'administration de toxines systémiques	53
3.2	Le rat rendu hémiparkinsonien suite à l'injection de 6-hydroxydopamine.....	55
CHAPITRE 4	LES PROTÉINES RESPONSABLES DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE DES NEURONES.	58
4.1	Les microfilaments.	58
4.2	Les neurofilaments	58
4.3	Les microtubules	59
4.4	La protéine tau	60
4.4.1	Rôles de tau dans l'initiation et le développement de la neurodégénérescence	62
CHAPITRE 5	RATIONNELLE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	65
5.1	Est-ce que la stimulation des récepteurs dopaminergiques est responsable de l'hyperphosphorylation de la protéine tau provoquée par l'augmentation des niveaux de dopamine dans la synapse?.....	65
5.2	Est-ce l'augmentation des niveaux de dopamine, provoquée par l'administration chronique de la L-DOPA dans la maladie de Parkinson, pourrait être associée à l'hyperphosphorylation de la protéine tau laquelle pourrait être en lien avec l'émergence des dyskinésies?.....	68

PARTIE 2 RÉSULTATS

CHAPITRE 6 RÔLE DE L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES D1 DANS LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE TAU DANS UN MODÈLE DE TRANCHES DE STRIATUM DE RATS	72
6.1 Dopamine D1 Receptor Activation Induces Tau Phosphorylation: Differential Involvement of PKA, Cdk5 and GSK3 Signaling Pathways	73
6.2 Résumé	72
6.3 Abstract	74
6.4 Introduction	74
6.5 Materials and Methods	76
6.5.1 Materials and reagents	76
6.5.2 Antibodies	76
6.5.3 Cell culture and treatments	77
6.5.4 Striatal section preparation	77
6.5.5 Western blot analysis	78
6.5.6 Immunocytochemical analysis	78
6.5.7 Lactate dehydrogenase (LDH) release assay	79
6.5.8 Statistical analysis	79
6.6 Results	80
6.6.1 D1 receptor activation induces tau phosphorylation at serine 214 site in SK-N-MC cells	80
6.6.2 D1 receptor activation induces tau phosphorylation at serine 214 sites in rat striatal sections	81
6.6.3 D1 receptor activation induces tau phosphorylation through cdk5 activation in rat striatal sections	82

6.6.4	D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation through GSK3 β activation in rat striatal sections	84
6.6.5	D1 receptor stimulation and tau phosphorylation are not associated with cellular damage in rat striatal sections	85
6.7	Discussion	86
6.8	References	93

CHAPITRE 7 ÉVÈNEMENTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU MODULÉE PAR LES RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES D1 DANS LES CELLULES SK-N-MC 111

7.1	Molecular and Cellular Events of Dopamine D1 Receptor-Mediated Tau Phosphorylation in SK-N-MC cells.....	111
7.2	Résumé.....	112
7.3	Abstract.....	113
7.4	Introduction	114
7.5	Materials and Methods	116
7.5.1	Materials and reagents.....	116
7.5.2	Antibodies	116
7.5.3	Cell culture and treatments	116
7.5.4	Cell proliferation assay (MTT)	117
7.5.5	Western blot analysis	117
7.5.6	Immunocytochemical analysis.....	118
7.5.7	Statistical analysis.....	118
7.6	Results	118
7.6.1	D1 receptor stimulation induced tau phosphorylation through cdk5 activation	118

7.6.2	D1 receptor stimulation induced tau phosphorylation through GSK3 β activation.....	121
7.6.3	D1 receptor stimulation affected SK-N-MC cells survival through cdk5 and GSK3 activities.....	122
7.7	Discussion.....	122
7.8	References.....	126

CHAPITRE 8 RÔLE DE LA PKA ET DES PROTÉINES DU CYTOSQUELETTE DANS LA MALADIE DE PARKINSON ET LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA..... 138

8.1	Striatal inhibition of protein kinase A prevents levodopa-induced neurochemical changes and abnormal involuntary movements in the hemiparkinsonian rat model.....	138
8.2	Résumé.....	139
8.3	Abstract.....	140
8.4	Introduction	141
8.5	Materials and Methods	142
8.5.1	Chemical reagents	142
8.5.2	Antibodies	143
8.5.3	Animals and 6-OHDA lesions.....	144
8.5.4	Rp-cAMPS intrastriatal infusion.....	144
8.5.5	L-DOPA treatments	145
8.5.6	Rotarod test.....	145
8.5.7	Analysis of AIMS.	146
8.5.8	Western blot analysis.	146
8.5.9	Immunofluorescence	147
8.5.10	Statistical analysis.....	148

8.6	Results	148
8.6.1	Validation of 6-OHDA-induced nigrostriatal dopamine denervation.....	148
8.6.2	LID-associated increases in Δ FosB expression, ERK1/2 activation and DARPP-32 phosphorylation were prevented by intrastriatal inhibition of PKA	150
8.6.3	Δ FosB, p-ERK1/2 and p-DARPP-32 levels were unaffected by continuous L-DOPA infusion	151
8.6.4	LID is associated with modification of cytoskeletal-associated proteins.....	152
8.6.5	Continuous infusion of L-DOPA or intrastriatal PKA inhibition prevented LID	152
8.7	Discussion	153
8.8	References	159
CHAPITRE 9 CONCLUSION.....		174
9.1	L'activation des récepteurs dopaminergiques D1, et non D2, provoque l'hyperphosphorylation de tau et les kinases PKA, Cdk5 et GSK3 jouent un rôle clé dans ce processus	174
9.2	Suite à la stimulation des récepteurs D1, l'activité de Cdk5 et de GSK3 est augmentée via un processus dépendant de l'activation de la PKA et de l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire.....	176
9.3	La phosphorylation de tau se produit de façon transitoire suite à la stimulation des récepteurs D1 et n'affecte pas la viabilité des neurones du striatum.....	178
9.4	L'expression des marqueurs connus des dyskinésies est prévenue par l'inhibition intrastriatale de la PKA ou l'infusion continue de L-DOPA. De plus, ces traitements préviennent de façon partielle ou totale l'émergence des complications motrices.....	184

9.5	L'inhibition intrastriatale de la PKA ou l'infusion continue du médicament n'affecte pas l'efficacité antiparkinsonienne de la L-DOPA.....	188
9.6	L'émergence des mouvements anormaux involontaires est associée à des modifications des protéines responsables du maintien du cytosquelette neuronal.....	188
9.7	Perspectives futures.....	193
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE		197

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma de la structure chimique des catécholamines	2
1.2 Schéma de la biosynthèse de la dopamine.....	2
1.3 Schéma des principales voies dopaminergiques centrales.....	4
1.4 Schéma de la structure des récepteurs dopaminergiques.	6
1.5 Schéma classique de la signalisation des récepteurs dopaminergiques.....	9
1.6 Schéma de l'organisation des circuits des mouvements moteurs volontaires.....	13
1.7 Représentation schématique des structures constituant les ganglions de la base.	13
1.8 Représentation schématique des voies directes et indirectes.....	15
2.1 Schéma du rôle proposé de l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 dans la dégénérescence des neurones du striatum	21
2.2 Schéma de la répercussion de la raréfaction de la dopamine striatale sur les circuits thalamo-corticaux des ganglions de la base	28
2.3 Représentation schématique du fonctionnement d'inhibiteurs de la MAO utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson.....	39
2.4 Schéma de l'apparition des complications motrices associées à la dopathérapie	43
2.5 Schéma des effets de la dopathérapie sur les circuits thalamo-corticaux des ganglions de la base	48
2.6 Schéma des voies de signalisation proposées pour être impliquées dans les dyskinésies induites par la L-DOPA.....	51

4.1	Schéma des molécules constitutives du cytosquelette	59
4.2	Schéma du rôle proposé de la phosphorylation anormale de tau dans la dégénérescence neuronale	63
6.1	D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation at PKA sites in SK-N-MC cells	98
6.2	D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation at PKA sites in rat striatal sections	100
6.3	D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation at cdk5/GSK3 sites in rat striatal sections	102
6.4	Cdk5 plays a role in tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation in rat striatal sections	104
6.5	GSK3 plays a role in tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation in rat striatal sections	106
6.6	Dopamine receptor stimulation is not associated with cellular death in rat striatal sections.....	108
6.7	After D1 receptor stimulation, tau is phosphorylated by activation of PKA, cdk5 and GSK3 β signaling pathways.....	109
7.1	Tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation occurred through a cdk5-dependent mechanism	131
7.2	Inhibition of the p35 proteolysis by the calcium dependent protease calpain prevents tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation	133
7.3	A role for GSK3 in the phosphorylation of tau induced by D1 receptor stimulation.....	135
7.4	Inhibition of cdk5 and GSK3 activity, but not PKA, prevented cellular death induced by D1 dopamine receptor stimulation in SK-N-MC cells.....	137
8.1	Experimental design of the study	164
8.2	Extent of the dopaminergic denervation induced by 6-OHDA lesions	165

8.3	Intrastriatal Rp-cAMPS infusions prevented increased levels of Δ FosB, p-ERK1/2 and p-DARPP-32 Thr34 after pulsatile L-DOPA treatment.....	167
8.4	Continuous L-DOPA infusion affected levels of Δ FosB, p-ERK1/2 and p-DARPP-32 Thr34	169
8.5	LID were associated with increased levels of phosphorylated tau	171
8.6	Pulsatile L-DOPA, pulsatile L-DOPA in combination with intrastriatal infusion of PKA inhibitor or continuous L-DOPA treatment improved accelerating rotarod performances.....	172
8.7	Effect of continuous L-DOPA infusion or intrastriatal PKA inhibition prior to L-DOPA treatment on AIMS.....	173
9.1	Schéma des voies de signalisation proposées pour être associées à la phosphorylation de tau induite par l'activation des récepteurs D1.....	182
9.2	Schéma des mécanismes moléculaires proposés pour être impliqués dans l'apparition des dyskinésies induites par la L-DOPA.....	192

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
AMPc	adénosine 3',5'- cyclic monophosphate
CAMKII	calmodulin kinase II
Cdk5	kinase 5 cycline dépendante
COMT	catéchol-O-méthyltransférase
CREB	cAMP response element binding protein
CRE	cAMP response element
DA	dopamine
DARPP-32	dopamine and cAMP regulated phosphoprotein 32kDa
DAT	dopamine transporter
DDC	dopa décarboxylase
DOPAC	acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
ERK	extra-cellular signal regulated kinase
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GPe	globus pallidus externe
GPI	globus pallidus interne
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HVA	acide homovanillique
MAO	inhibiteurs de la monoamine oxydase
JNK	c-JUN N-terminal kinase
L-DOPA	L-dihydroxyphénylalanine
MAO	monoamine oxydase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPT	microtubule associated protein tau
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
MFB	medial forebrain bundle
MPTP	1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6- tétrahydropyridine
MSN	medium spiny neurons

NMDA	acide N-méthyl-D aspartique
NST	noyau sous-thalamique
PLA2	phospholipase A2
PP1	protéine phosphatase 1
PP2B	protéine phosphatase 2B
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
SAPK	stress-activated protein kinase
SNC	substance noire compacte
SNr	substance noire réticulée
STEP	striatal enriched tyrosine phosphatase
TH	tyrosine hydroxylase
VMAT	vesicular monoamines transporter
3-OMD	3-O-méthyl-dopa
5-HT	sérotonine
6-OHDA	6-hydroxydopamine

PARTIE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur jouant un rôle clé au niveau du cerveau. Faisant partie de la grande famille des catécholamines, elle a longtemps été considérée comme étant exclusivement une intermédiaire dans la synthèse de l'adrénaline et de la noradrénaline. Ce n'est qu'au milieu des années 50 que Arvid Carlsson et ses collaborateurs démontrèrent que la dopamine était un neurotransmetteur à part entière (Carlsson *et coll.* 1958) et qu'elle était présente en quantité importante dans certaines parties du cerveau impliquées dans le contrôle des mouvements moteurs (Sano *et coll.* 1959). Au même moment, Ehringer et Hornykiewicz ont démontré que la baisse de dopamine pourrait être à la base des symptômes extrapyramidaux dans la maladie de Parkinson (Ehringer et Hornykiewicz 1960).

1.1.1 Biosynthèse et métabolisme de la dopamine

La dopamine ainsi que la noradrénaline et l'adrénaline possèdent une structure chimique commune appelée noyau catéchol (Figure 1.1). Ces molécules sont synthétisées à partir de la tyrosine, un acide aminé qui suite à son hydroxylation par la tyrosine hydroxylase (TH) est transformé en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) (Figure 1.2). L'activité de la TH est d'ailleurs considérée comme l'étape limitante de la biosynthèse des catécholamines (Bear *et coll.* 1999). La L-DOPA, à son tour, est très rapidement métabolisée en dopamine par la DOPA

décarboxylase (DDC) et la concentration en dopamine dans la terminaison nerveuse est modulée par les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT), responsables du transport de la dopamine vers des vésicules de stockage. De cette façon, la concentration cytoplasmique de dopamine est contrôlée et sa dégradation, se produisant via les monoamines oxydases (MAO), est prévenue.

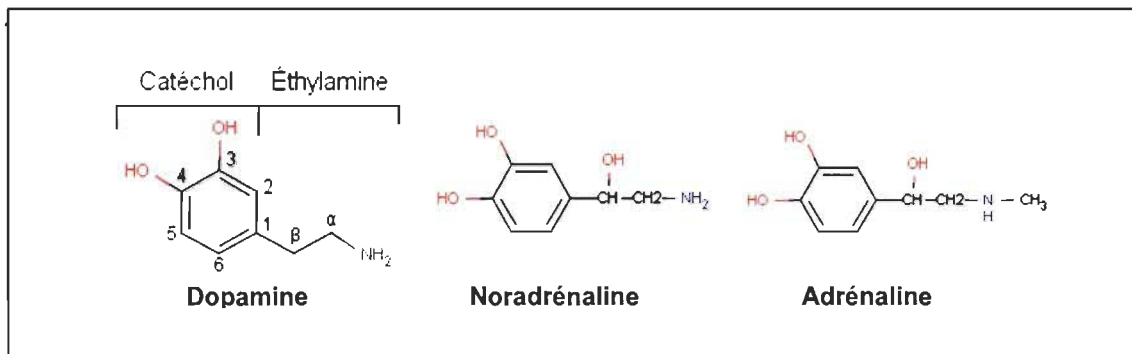


Figure 1.1 : Schéma de la structure chimique des catécholamines (Tiré de Bear *et coll.* 1999)

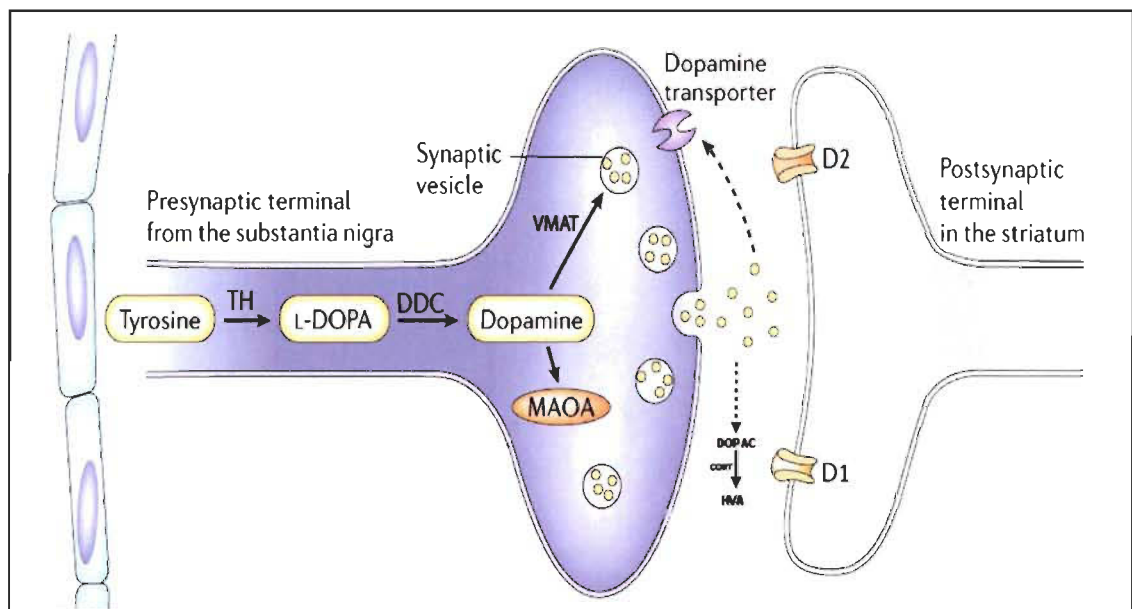


Figure 1.2 : Schéma de la biosynthèse de la dopamine (Tiré de Youdim *et coll.*, Nature Reviews Neuroscience 7 (2006) 295-309)

Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison nerveuse, la dopamine est relâchée dans la fente synaptique et vient agir sur les récepteurs dopaminergiques situés principalement sur l'élément postsynaptique. Il est à noter que des autorécepteurs dopaminergiques sont également présents sur la terminaison présynaptique, modulant la relâche de la dopamine dans la fente synaptique. Après avoir exercé son action, la dopamine peut soit être convertie en métabolites au niveau de la fente synaptique ou être recyclée vers l'élément présynaptique. En effet, afin de maintenir l'homéostasie et de réguler l'intensité et la durée de l'activité du neurotransmetteur, la dopamine est en partie retournée vers l'élément présynaptique via l'activité des transporteurs de la dopamine (DAT) (Sotnikova *et coll.* 2006). Ces derniers, faisant partie de la famille des transporteurs membranaires des neurotransmetteurs couplés au NaCl_2 , utilisent l'énergie de la pompe Na^+/K^+ ATPase afin de permettre la recapture de la dopamine après sa relâche, modulant ainsi sa concentration à la synapse et son temps d'interaction avec les récepteurs pré-et post-synaptiques.

Une fois retournée dans l'élément présynaptique, la dopamine peut être emmagasinée de nouveau dans les vésicules synaptiques pour une utilisation ultérieure ou être convertie en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par la monoamine oxydase intraneuronale. La dopamine restante au niveau de la fente synaptique est, quant à elle, convertie en 3-methoxytyramine puis en acide homovanillique (HVA) via l'activité de la catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) et de la MAO extrasynaptique (Youdim *et coll.* 2006).

1.1.2 Rôles centraux et périphériques de la dopamine

En plus de jouer un rôle prépondérant dans le contrôle du mouvement moteur, la dopamine module une variété de fonctions au niveau central allant de la régulation endocrine à la prise de nourriture en passant par le contrôle des émotions et la modulation des comportements de dépendance. De plus, au niveau périphérique, la dopamine est impliquée dans le contrôle de la relâche de catécholamines et de la sécrétion d'hormones, en plus de jouer un rôle clé

au niveau du système cardio-vasculaire, rénal et gastro-intestinal (Jaber *et coll.* 1996; Missale *et coll.* 1998).

1.1.3 Principales voies dopaminergiques centrales

Les techniques permettant d'identifier les circuits utilisant la dopamine ont rendu possible l'identification de plusieurs voies dopaminergiques majeures dans le cerveau. Trois d'entre elles sont particulièrement importantes et prennent naissance dans le mésencéphale (Figure 1.3). Tout d'abord, la voie mésolimbique est le faisceau dopaminergique associé au circuit de la récompense. Cette voie est impliquée dans la mémoire et la motivation de nos comportements émotionnels.

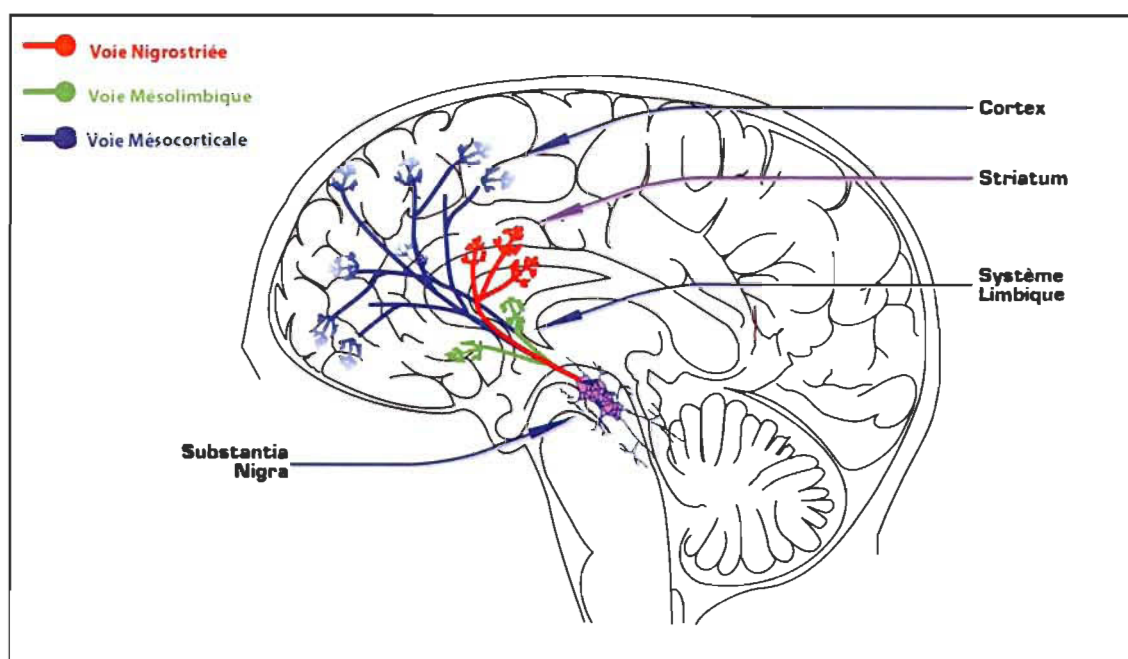


Figure 1.3 : Schéma des principales voies dopaminergiques centrales (Tiré de http://www.pharmacomedicale.org/Fiche_999.html)

Les corps cellulaires de ces projections sont situés dans l'aire tegmentale ventrale et se terminent dans des structures du système limbique comme le noyau accumbens, le septum, l'amygdale et le tubercule olfactif. Des

dysfonctions de ces voies de projection sont associées à des troubles comme les psychoses, l'hyperactivité et les déficits d'attention. La voie mésocorticale trouve également son origine dans l'aire tegmentale ventrale mais innerve principalement le cortex frontal cingulé et le cortex entorhinal. Cette voie intervient dans le traitement cognitif des informations et un dysfonctionnement pourrait être à l'origine des symptômes de la schizophrénie.

La voie nigrostriée, quant à elle, joue un rôle prépondérant dans le contrôle de l'initiation motrice. Cette voie prend naissance au niveau de la substance noire compacte et projette jusqu'au striatum (noyau caudé et putamen). Je m'intéresserai particulièrement à cette dernière puisqu'elle est la cible de la neurodégénérescence caractérisant la maladie de Parkinson (Bear *et coll.* 1999).

1.2 Les récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs dopaminergiques font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G, formés de sept domaines transmembranaires (Figure 1.4). Leur interaction avec une protéine hétérotrimérique dépendante du GTP (Protéine G) module les voies de signalisation intracellulaire. Au nombre de cinq, les récepteurs dopaminergiques sont subdivisés en deux grandes familles selon leurs caractéristiques structurales et pharmacologiques : la classe des récepteurs D1, activant l'adénylate cyclase et permettant l'accumulation d'adénosine 3', 5'-cyclic monophosphate (AMPc) et la classe des récepteurs D2, inhibant l'activité de l'adénylate cyclase (Spano *et coll.* 1978). La famille des récepteurs D1, appelée D1-like, est formée des récepteurs D1 et D5 présentant une homologie de structure. Quant à la famille des D2-like, elle comprend les récepteurs D2, D3 et D4 (Missale *et coll.* 1998; Neve *et coll.* 2004). Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés de façon distinctive dans différentes régions du cerveau.

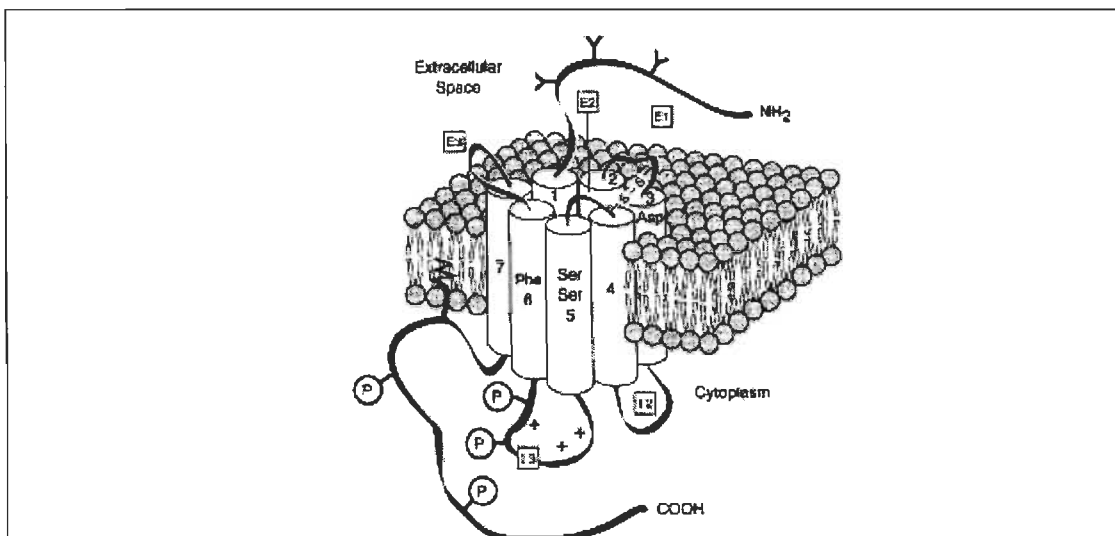


Figure 1.4 : Schéma de la structure des récepteurs dopaminergiques (Tiré de Missale *et coll.*, *Physiological Reviews* 87 (1998) 189-224)

1.2.1 Localisation des récepteurs D1-like

Les récepteurs D1 sont les plus abondants de tous les récepteurs dopaminergiques et leur présence est davantage marquée au niveau du cerveau. Ils sont principalement exprimés au niveau du striatum et du noyau accumbens, où ils sont majoritairement localisés sur les neurones épineux de taille moyenne (medium spiny neurons MSNs), utilisant l'acide gamma-amino-butyrique (GABA) comme neurotransmetteur (De Keyser *et coll.* 1988). Ces neurones projettent vers le globus pallidus interne et la substance noire réticulée constituant la voie directe qui sera décrite ultérieurement. Les récepteurs dopaminergiques D1 sont principalement présents sur la terminaison post-synaptique mais on en retrouve également, de façon beaucoup moins importante, au niveau de l'élément présynaptique des neurones glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus. Les récepteurs D1 sont aussi présents en quantité moyenne au niveau du globus pallidus, de la substance noire et du cervelet et en faibles quantités au niveau du cortex et d'autres régions du cerveau (Jackson *et coll.* 1994; Jaber *et coll.* 1996; Missale *et coll.* 1998; Vallone *et coll.* 2000).

Les récepteurs D5 se retrouvent également sur les neurones épineux de taille moyenne GABAergiques et sur les neurones cholinergiques du striatum, avec des niveaux plus élevés au niveau du noyau accumbens et des tubercules olfactifs. De plus, les récepteurs D5 sont présents au niveau de la substance noire compacte, de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du globus pallidus et du cortex (Ciliax *et coll.* 2000; Khan *et coll.* 2000).

1.2.2 Localisation des récepteurs D2-like

Les récepteurs D2 centraux sont distribués de façon très similaire aux récepteurs D1 avec en plus, leur présence au niveau de la substance noire compacte et de l'aire tegmentale ventrale où ils jouent probablement un rôle d'autorécepteurs (Jackson *et coll.* 1994; Vallone *et coll.* 2000; Sealfon and Olanow 2000). Dans le striatum, les récepteurs D2 sont exprimés par les interneurons cholinergiques ainsi que par les neurones épineux moyens GABAergiques projetant vers le globus pallidus externe, constituant la voie indirecte qui sera décrite ultérieurement. Les récepteurs D3 sont principalement localisés dans les régions limbiques du cerveau. Leur plus grande densité se retrouve au niveau des neurones épineux moyens GABAergiques du noyau accumbens (Levesque *et coll.* 1992; Landwehrmeyer *et coll.* 1993; Murray *et coll.* 1994) alors qu'ils se retrouvent en plus faible concentration au niveau du globus pallidus, du thalamus, de l'amygdale, de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale. Quand aux récepteurs D4, bien que présents en très faible quantité au niveau striatum, du noyau accumbens et du globus pallidus, ils sont présents en densité appréciable au niveau du cortex frontal, de la médulla, de l'amygdale, de l'hypothalamus, de l'hippocampe et du mésencéphale (Van Tol *et coll.* 1991; Murray *et coll.* 1995; Primus *et coll.* 1997).

1.2.3 Signalisation des récepteurs dopaminergiques D1-Like

Les récepteurs dopaminergiques, tel que mentionné précédemment, propagent leurs signaux à travers la cellule par le biais de protéines G. Les récepteurs de

la famille D1-like sont couplés à une protéine G stimulatrice ($G_{\alpha_s}/G_{\alpha_{olf}}$) qui, une fois activée, libère sa sous-unité α pour permettre sa liaison au domaine C2 de l'adénylate cyclase, augmentant ainsi l'efficacité catalytique de l'enzyme (Figure 1.5). À son tour, l'adénylate cyclase catalyse la conversion de l'ATP en AMP et provoque l'accumulation d'AMP cyclique (AMPC) dans la cellule. L'AMPC agit à titre d'intermédiaire puisqu'elle se lie, entre autres, à la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (PKA), provoquant sa désinhibition et l'activation de la protéine. Une fois activée, la PKA est en mesure de phosphoryler une panoplie de substrats dont plusieurs protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire et dans la régulation de l'expression des gènes. La PKA peut, entre autre, agir sur le facteur de transcription cAMP response element binding protein (CREB), sur des récepteurs couplés à des canaux ioniques comme les récepteurs activés par l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), les récepteurs activés par l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl isoazol-4-propionate (AMPA) et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ainsi que sur la protéine dopamine and cAMP regulated phosphoprotein-32kDa (DARPP-32) enrichie au niveau du striatum (Neve *et coll.* 2004).

L'activation de CREB via la stimulation des récepteurs dopaminergiques D1 nécessite la phosphorylation de la sérine 133 par la PKA (Cole *et coll.*, 1995). CREB peut également être phosphorylé par la calcineurine (PP2B), une protéine dont l'activation est dépendante des niveaux de calcium intracellulaire. Suite à l'activation des récepteurs D1, la phosphorylation de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA peut être responsable de l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire, mais ce phénomène peut également se produire suite à la stimulation des récepteurs D2 via l'activation de la phospholipase $C\beta 1$ (PLC $\beta 1$) par les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine $G_{i/o}$. La phosphorylation de CREB par la PP2B constitue donc une voie de signalisation importante puisqu'elle peut se produire suite à l'activation des récepteurs D1 et D2. Une fois activé, CREB se lie à son élément de réponse, le cAMP response element (CRE) sur l'ADN,

induisant ainsi la transcription de plusieurs gènes, par exemple ceux de la famille des fos.

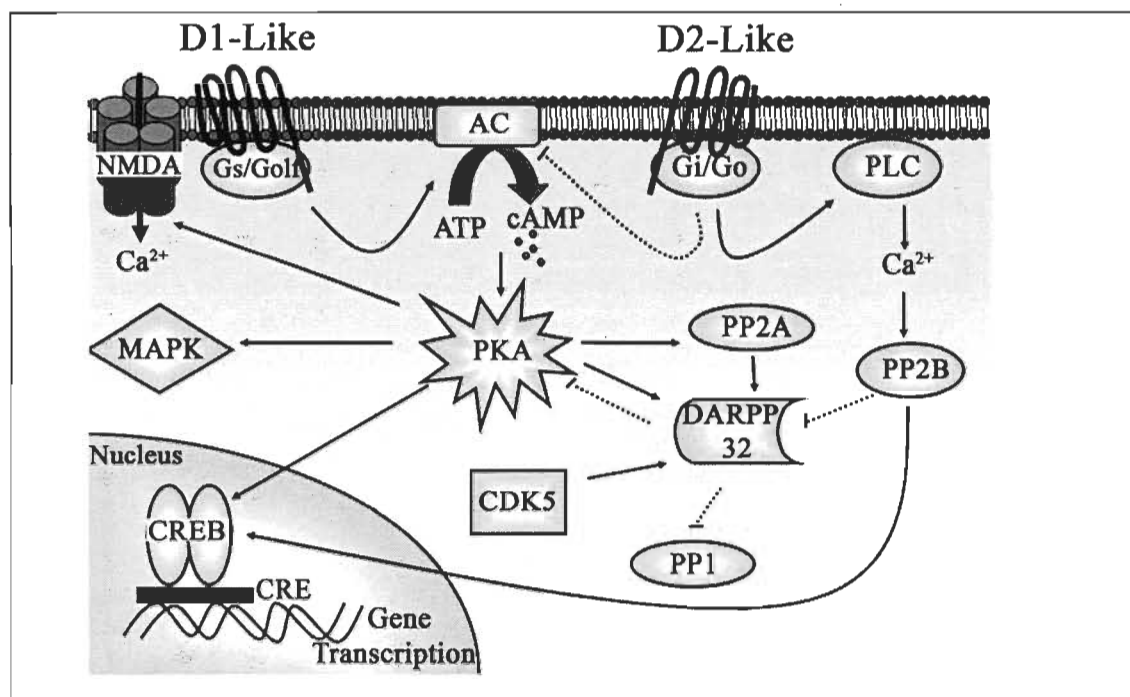


Figure 1.5 : Schéma classique de la signalisation des récepteurs dopaminergiques (Tiré de Lebel *et coll.*, Canadian Journal of Neurological Science 34 (2007) 18-29)

Une autre cible importante de PKA est DARPP-32. Cette protéine, lorsque phosphorylée par la PKA sur la thréonine 34, est en mesure d'inhiber la protéine phosphatase 1 (PP1), empêchant ainsi la déphosphorylation de plusieurs protéines contribuant à la modulation de la signalisation dopaminergique des récepteurs D1. DARPP-32 peut également être phosphorylée sur la thréonine 75 par la kinase 5 cycline dépendante (Cdk5), menant ainsi à l'inhibition de la PKA (Bibb *et coll.* 1999).

La PKA est également en mesure d'agir sur plusieurs canaux ioniques. Par exemple, l'activation de PKA provoque une augmentation de l'activité des canaux calciques de type L et une diminution de l'activité des canaux calciques de type N et P/Q. Elle module également le flux des récepteurs AMPA et GABA,

en plus d'augmenter l'activité des récepteurs NMDA par la phosphorylation de la sous-unité NR1 (Neve *et coll.* 2004). DARPP-32, en inhibant les phosphatases et empêchant la déphosphorylation de la sous-unité NR1, peut elle aussi contribuer à l'activation des récepteurs NMDA (Neve *et coll.* 2004). Récemment, il a été démontré que le récepteur D1, par sa partie C terminale, pouvait interagir directement avec les sous-unités NR1A et NR2 des récepteurs NMDA, modulant réciproquement l'activité et le « trafficking » des récepteurs (Lee *et coll.* 2002; Fiorentini *et coll.* 2003; Pei *et coll.* 2004).

Plusieurs études rapportent que la PKA pourrait de plus activer la voie des kinases MAP (Mitogen-activated protein kinase), incluant ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Price *et coll.* 1999; Gerfen *et coll.* 2002), p38 MAPK et JNK (c-jun N-terminal kinase) (Zhen *et coll.* 1998). La modulation de p38 et de JNK se ferait directement par le biais de la PKA alors que l'activation de ERK, via la stimulation des récepteurs D1, serait partiellement indépendante de PKA ou de l'AMP cyclique (Weissman *et coll.* 2004). Par exemple, ERK pourrait être activée via la stimulation d'une GTPase RAP-1 modulée par l'AMPc (De Rooij *et coll.* 1998).

1.2.4 Signalisation des récepteurs D2-Like

Les récepteurs de la famille D2 sont, pour leur part, couplés à une protéine G inhibitrice ($G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$). Une fois activée, la sous-unité α se détache de la protéine G inhibitrice et se lie au domaine C1 cytosolique de l'adénylate cyclase, empêchant son activation. Contrairement aux récepteurs D1, l'activation des récepteurs D2 prévient donc l'accumulation intracellulaire de l'AMP cyclique et, de ce fait, exerce l'effet inverse sur la PKA et les substrats qui lui sont associés. En effet, la stimulation des récepteurs D2 diminue la phosphorylation de DARPP-32 sur la thréonine 34, soit en évitant l'augmentation des niveaux d'AMP cyclique, et par le fait même l'activation de la PKA, ou encore par l'activation de la PP2B via la phospholipase C (PLC) (Nishi *et coll.* 2000). Contrairement aux récepteurs D1, le rôle joué par les sous-unités $\beta\gamma$ de la

protéine G inhibitrice dans la signalisation des récepteurs D2 est bien connu. Sans toutefois entrer dans les détails, notons que par ce mécanisme, la stimulation des récepteurs D2 peut moduler l'activité de CREB, de canaux potassiques, calciques et sodiques, de la protéine kinase C, des récepteurs NMDA et GABA, de la phospholipase A2 (PLA2), C β (PL C β) et de MAP kinases comme ERK, SAPK, JNK, RAS et MEK (Neve *et coll.* 2004).

La complexité de la signalisation des récepteurs dopaminergiques réside dans le fait qu'un seul récepteur est en mesure, par des voies de signalisation distinctes ou se chevauchant en plusieurs points, d'activer plusieurs protéines effectrices. Ce phénomène constitue donc un défi de taille dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la signalisation dopaminergique.

1.3 La dopamine et le contrôle des mouvements moteurs volontaire

L'exécution de mouvements moteurs volontaires et involontaires repose sur la réalisation dans l'espace et dans le temps, de contractions musculaires initiées et coordonnées par différentes structures du système nerveux central (Groenewegen 2003). Une interaction finement contrôlée entre ces structures et les neurones environnants, impliqués dans l'exécution motrice, sont essentiels pour permettre la réalisation de mouvements appropriés. Les mouvements moteurs volontaires sont essentiellement initiés au niveau du cortex moteur qui, via un relais dans les circuits prémoteurs, achemine les informations vers la moelle épinière et projette vers les muscles afin de permettre l'exécution du mouvement. Toutefois, avant de se rendre à la moelle épinière, l'information en provenance du cortex est intégrée au niveau du cervelet et des ganglions de la base afin de permettre la coordination et l'élaboration du signal qui servira à l'exécution du mouvement (Figure 1.6).

1.3.1 Organisation fonctionnelle des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont constitués d'un ensemble de noyaux sous corticaux incluant le striatum (caudé et putamen), le globus pallidus interne et externe, le noyau sous thalamique ainsi que la substance noire réticulée et compacte (Obeso *et coll.* 2008) (Figure 1.7). Ils ont longtemps été considérés comme étant principalement des centres de contrôle moteur et à la fin des années 50, plusieurs découvertes suggèrent que les ganglions de la base seraient effectivement impliqués dans le contrôle des mouvements et plus particulièrement dans l'exécution des mouvements automatiques (Marsden 1982). De nos jours, on considère que les ganglions de la base sont plutôt subdivisés en circuits moteurs, oculo-moteurs, cognitifs et limbiques (Smith *et coll.* 1998; Middleton and Strick 2000), contrôlant ainsi la sélection et l'exécution des mouvements volontaires, mais également les aspects cognitifs, associatifs et émotionnels des comportements moteurs. Cette organisation anatomo-fonctionnelle a modifié la vision traditionnelle des ganglions de la base, mais il n'en demeure pas moins que ceci constitue une schématisation très simplifiée de circuits neuronaux très complexes.

La boucle motrice est de loin la plus connue et la mieux caractérisée de tous les circuits des ganglions de la base. Cette voie est impliquée, comme son nom l'indique, dans la sélection et l'exécution de mouvements moteurs appropriés. Prenant ses origines des aires motrices et prémotrices du cortex, la boucle motrice projette vers la partie dorsolatérale du striatum, considérée comme la porte d'entrée des ganglions de la base. La majorité des cellules du striatum sont des neurones épineux de taille moyenne.

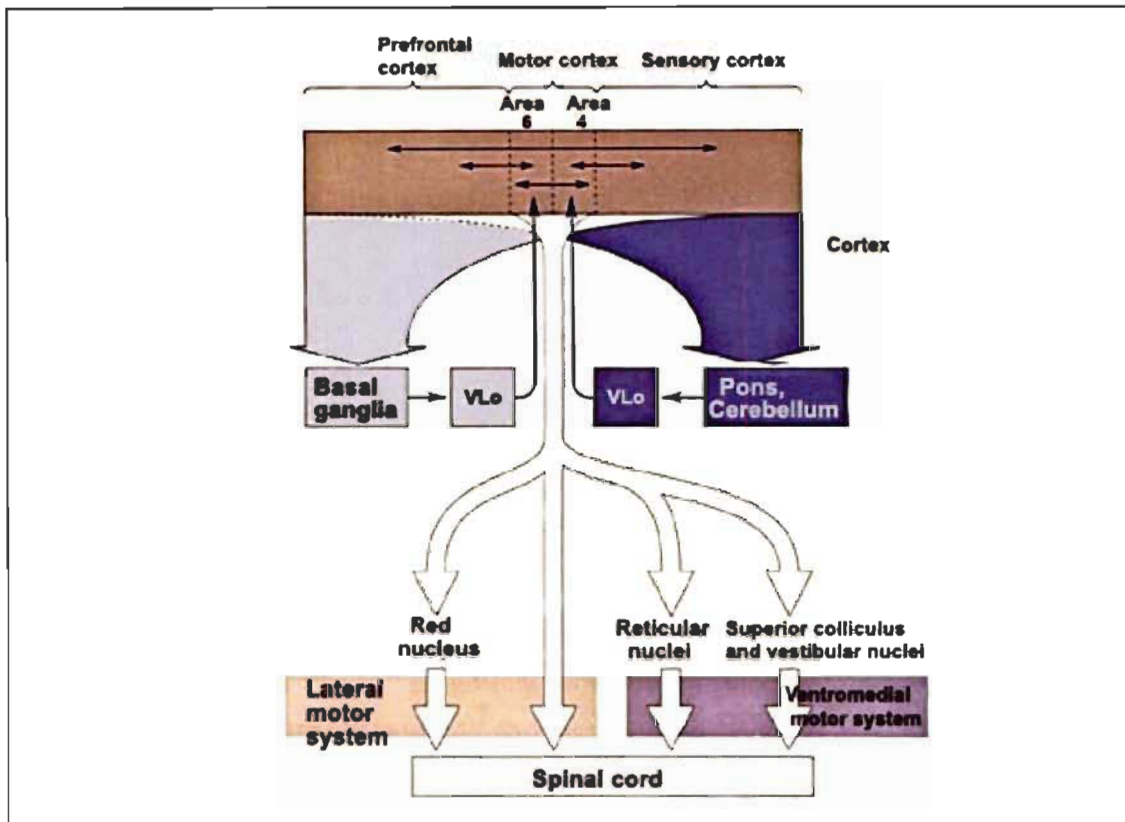


Figure 1.6 : Schéma de l'organisation des circuits des mouvements moteurs volontaires (Tiré de http://www.thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_06/a_06_cr/a_06_cr_mou/a_06_cr_mou.html).

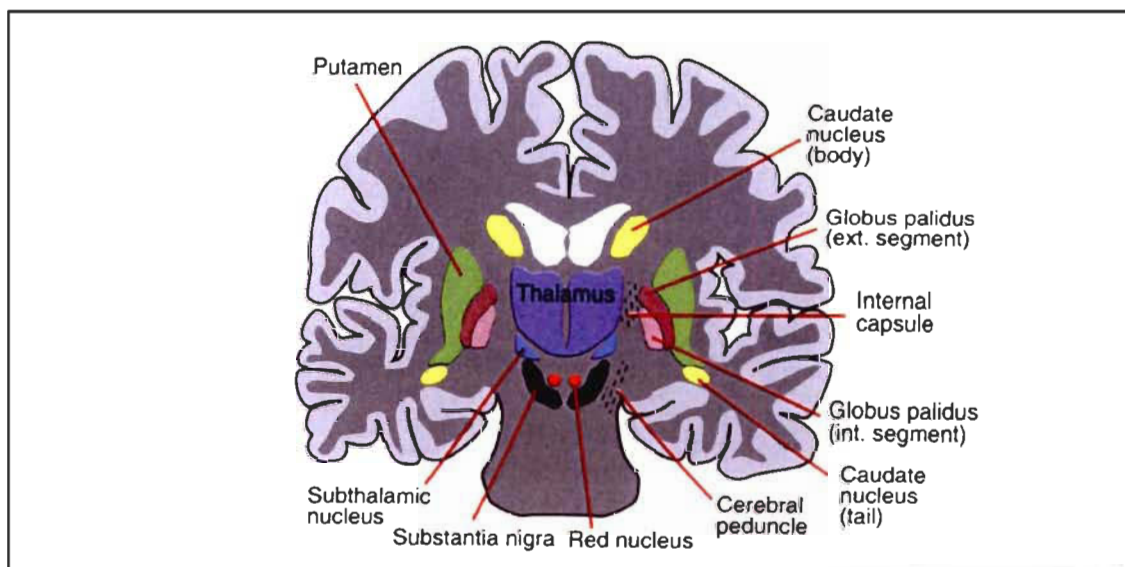


Figure 1.7 : Représentation schématique des structures constituant les ganglions de la base (Tiré de <http://www.inisanet.unisa.edu>)

Ces derniers, présentant de larges arborisations dendritiques, en plus de recevoir des afférences excitatrices glutamatergiques du cortex et du thalamus, reçoivent également une innervation dopaminergique massive provenant de la substance noire compacte et de l'aire tegmentale ventrale, innervant respectivement la partie dorso-latérale et la partie dorso-médiale et ventrale du striatum. Ces voies d'entrées dopaminergiques intègrent la séquence spatio-temporelle complexe d'évènements neuronaux assurant le flux d'informations corticales à travers les ganglions de la base (Lewis and Barker 2009) modulant, par exemple, l'innervation glutamatergique excitatrice en provenance de la grande majorité des aires corticales et du thalamus (Fisone *et coll.* 2007). À partir du striatum, les projections se divisent en deux principales voies : les voies directes et indirectes.

1.3.2 Les voies directes et indirectes

Les deux principales voies de sortie du striatum, la voie directe et indirecte, prennent naissance dans sa partie dorsale et projettent vers la partie interne du globus pallidus (GPi) et la substance noire réticulée (SNr), considérés comme la principale porte de sortie des noyaux gris centraux. Le fin contrôle de la stimulation dopaminergique exercée sur ces deux voies, compétitrices, mais complémentaires, régule de façon précise l'exécution des mouvements moteurs.

La voie directe, aussi appelée striatonigrale, exprime principalement les récepteurs dopaminergiques D1. Elle utilise le GABA comme principal neurotransmetteur et coexprime les neuropeptides substance P et dynorphine. La voie directe établit une connexion inhibitrice GABAergique entre le striatum et les neurones du GPi et de la SNr qui, à leur tour, exercent une influence GABAergique inhibitrice sur le thalamus, lui-même projetant des fibres glutamatergiques excitatrices sur le cortex et le striatum. De son côté, la voie dopaminergique indirecte, aussi appelée striatopallidale, projette également vers le GPi et la SNr via un relais par le globus pallidus externe (GPe) et le noyau sous thalamique (STN). Ces neurones expriment principalement les récepteurs

dopaminergiques D2, utilisent le GABA comme principal neurotransmetteur et coexpriment l'enképhaline comme neuropeptide (Figure 1.8).

À partir du striatum, la voie indirecte projette des fibres GABAergiques inhibitrices vers le GPe qui, à son tour, exerce des influences GABAergiques inhibitrices sur le STN. De là, des projections glutamatergiques excitatrices influencent le GPi et la SNr qui, à leur tour, envoient des fibres GABAergiques inhibitrices vers le thalamus, lui-même exerçant une influence glutamatergiques excitatrices sur le cortex et le striatum.

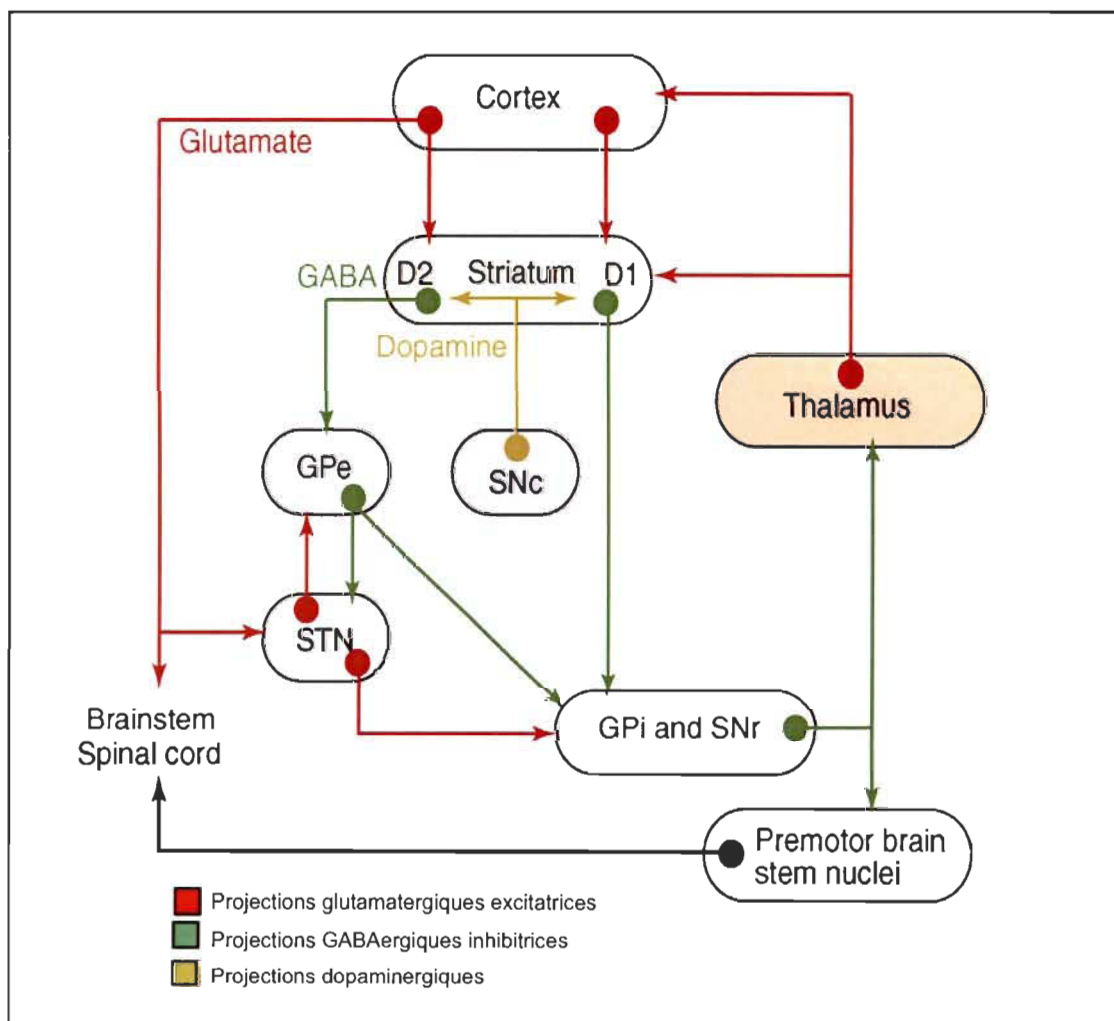


Figure 1.8 : Représentation schématique des voies directes et indirectes (Tiré de Cenci A. Trends in Neuroscience 30 (2007) 236-243)

La dopamine, en provenance de la substance noire compacte (SNc), module donc l'activation des neurones du striatum et le fonctionnement harmonieux des ganglions de la base repose sur un équilibre entre la voie directe et indirecte.

La dopamine exerce à la fois une influence excitatrice sur les neurones de la voie directe et une influence inhibitrice sur les neurones de la voie indirecte. En agissant sur les récepteurs D1, la dopamine provoque l'excitation des neurones GABAergiques inhibiteurs de la voie directe exerçant une influence inhibitrice sur le GPi et la SNr. Ces derniers étant davantage inhibés, il en résulte une diminution de l'activité inhibitrice exercée par le GPi et la SNr sur le thalamus et une augmentation de l'activité de la voie thalamo-corticale excitatrice, facilitant ainsi le mouvement. À l'opposé, la dopamine, en agissant sur les récepteurs D2, impose une forte inhibition des neurones GABAergiques inhibiteurs de la voie indirecte, levant l'inhibition exercée sur le GPe et augmentant l'inhibition GABAergique exercée sur le noyau sous-thalamique. Il en résulte donc une diminution de l'activité excitatrice glutamatergique exercée par le STN sur le GPi et la SNr et donc, une diminution de l'activité inhibitrice du GPi et de la SNr exercée sur le thalamus. Par conséquent, on observe une augmentation de l'activation de la voie thalamo-corticale excitatrice, facilitant encore une fois l'activité locomotrice. La relâche de dopamine, en agissant de façon opposée sur la voie directe et indirecte, exerce donc un contrôle très rigoureux des informations transmises aux voies de sorties du striatum, permettant la réalisation de mouvements moteurs appropriés (Cenci 2007; Jenner 2008).

CHAPITRE 2

CONSÉQUENCES D'UN DÉRÈGLEMENT DE LA TRANSMISSION DOPAMINERGIQUE DANS LE CERVEAU

2.1 La neurodégénérescence associée à des dysfonctions de la transmission dopaminergique

Des dérèglements dans la neurotransmission dopaminergique sont associés à des conditions pathologiques telles l'hyperprolactinémie, la maladie de Parkinson, la schizophrénie, le syndrome de Gilles de Latourette, la maladie de Huntington, l'hyperactivité et les déficits d'attention ainsi que les troubles compulsifs et la dépendance (Hornykiewicz 1973; Robertson and Stern 1997; Abi-Dargham *et coll.* 2000; Jakel and Maragos 2000; Castellanos and Tannock, 2002; Hurley and Jenner 2006). Des médicaments agissant sur les récepteurs dopaminergiques sont très efficaces pour atténuer les symptômes de ces affections, mais leur utilisation est fréquemment associée à l'apparition d'effets secondaires très importants. Par exemple, l'utilisation de médicaments bloquant les récepteurs dopaminergiques est fréquemment associée à l'apparition de syndromes extrapyramidaux (tremblements, rigidité, akinésie) alors que des médicaments stimulant de façon chronique ces récepteurs sont susceptibles de provoquer l'apparition de troubles du mouvement (Chase *et coll.* 1993; Bedard *et coll.* 1999; Blanchet 2003; Jenner 2003).

Dans des conditions physiologiques, la dopamine est relâchée de façon tonique dans la synapse et, après avoir stimulé les récepteurs dopaminergiques, est rapidement métabolisée dans l'espace extracellulaire ou est recyclée par les transporteurs de la dopamine présents sur l'élément présynaptique des neurones dopaminergiques. Toutefois, dans des conditions où de grandes quantités du neurotransmetteur s'accumulent dans la synapse, par exemple lorsque l'activité des transporteurs de la dopamine est réduite sous l'action de drogues comme l'amphétamine ou la méthamphétamine (Schmidt *et coll.* 1985),

des phénomènes de mort neuronale ont été observés (Gerhardt *et coll.* 1996; LaVoie and Hastings 1999).

2.1.1 Mécanismes moléculaires sous-jacents à la neurodégénérescence induite par la dopamine

La toxicité induite par la dopamine au niveau du striatum a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche et deux hypothèses générales ont été formulées pour expliquer ce phénomène. La première se rapporte à la dopamine elle-même qui, via ses produits d'oxydation comme les quinones et les radicaux oxygénés, peut mener à un stress oxydatif dans la cellule (Halliwell 1992; Hastings 1995). La seconde hypothèse, quant à elle, fait référence à la stimulation non physiologique des récepteurs dopaminergiques. Dans une telle condition, des modifications dans la signalisation intracellulaire des neurones sont fréquemment observées et sont associées à des dysfonctions neuronales persistantes et/ou à l'initiation de processus neurodégénératifs (Wersinger *et coll.* 2004; Aubert *et coll.* 2005; Bozzi et Borelli 2006). Je m'intéresserai particulièrement à la seconde hypothèse puisqu'elle est à la base de mes travaux de recherche.

2.1.2 Implication de la signalisation des récepteurs dopaminergiques dans la dégénérescence des neurones du striatum

L'avancement des connaissances dans la compréhension du fonctionnement des récepteurs dopaminergiques a permis une meilleure compréhension des voies de signalisation intracellulaires mais ce n'est que récemment que la signalisation des récepteurs à la dopamine a été mise en lien avec les dysfonctions neuronales et la neurodégénérescence. La première indication de ce phénomène fut démontrée, tel que mentionné précédemment, par les effets néfastes de la métamphétamine, provoquant une accumulation importante des niveaux de dopamine dans la synapse, sur les neurones du striatum de rongeurs (Reynolds *et coll.* 1998). Cet effet a été mis en lien avec l'activation

des récepteurs D1 puisque l'utilisation d'antagoniste D1, contrairement aux antagonistes D2, était en mesure de prévenir les dommages cellulaires. De plus, il a récemment été démontré, sur des cellules de neuroblastomes humains, les SK-N-MC, n'exprimant de façon endogène que le récepteur D1, que l'activation de ce dernier jouerait un rôle clé dans la toxicité induite par la dopamine (Chen *et coll.* 2003). C'est alors que la signalisation des récepteurs D1 fut pointée du doigt comme étant impliquée dans les maladies neurodégénératives.

Les MAPkinases, composées de trois principaux groupes soit ERK, p-38 et JNK, sont des protéines reconnues pour être impliquées dans divers processus menant à la mort cellulaire. Il a été démontré que l'activation de JNK et p-38 peut être provoquée par l'auto-oxydation de la dopamine. Toutefois, l'activation de ERK, elle, est plutôt attribuable à l'activation sélective des récepteurs D1 (Luo *et coll.* 1998; Chen *et coll.* 2004; Chen and Sidhu 2005) via l'activation de la voie G_s /AMPc/PKA/Rap-1/B-Raf/MEK (Vossler *et coll.* 1997; Dugan *et coll.* 1999; Schmitt and Stork 2002). Il a récemment été démontré, *in vivo*, que l'activation des récepteurs D1 et de la PKA par la dopamine induit la phosphorylation et l'inactivation de la phosphatase STEP (Striatal-enriched tyrosine phosphatase), alors incapable de déphosphoryler et d'inactiver ERK dans le striatum (Paul *et coll.* 2000). Sous sa forme phosphorylée, ERK serait retenue dans le cytoplasme par une interaction avec la β -arrestine2, permettant ainsi la phosphorylation de plusieurs substrats inhabituels et induisant des dysfonctions dans la signalisation intracellulaire associées à la mort apoptotique des neurones du striatum (Chen *et coll.* 2009).

Cdk5, une sérine/thréonine kinase normalement impliquée dans la fonction et la survie neuronale, est une autre protéine suspectée d'être à la base de la perte neuronale dans plusieurs maladies neurodégénératives (Patrick *et coll.* 1999; Dhavan and Tsai 2001; Borghi *et coll.* 2002; Shelton and Johnson 2004). L'activation de Cdk5 est intimement liée à la stimulation des récepteurs D1 puisqu'il a été démontré, dans des modèles animaux, que l'administration

chronique d'agonistes D1, et non D2, induirait l'augmentation des niveaux d'expression d'un facteur de transcription, Δ FosB, pour lequel Cdk5 est une cible potentielle (Doucet *et coll.* 1996; Bibb *et coll.* 2001a; Cyr *et coll.* 2003; McClung *et coll.* 2004; Aubert *et coll.* 2005). De plus, dans des conditions où les niveaux de dopamine extracellulaire sont anormalement élevés, comme c'est le cas chez la souris dont le gène pour le transporteur de la dopamine a été inactivé (DATKO), les niveaux de Cdk5 activé sont augmentés et sont en relation étroite avec la dégénérescence observée dans les neurones GABAergiques du striatum (Cyr *et coll.* 2003). Lorsque hyperactivé, Cdk5 peut altérer le fonctionnement de plusieurs protéines effectrices influençant, par le fait même, la signalisation intracellulaire. Par exemple, Cdk5 peut induire la phosphorylation de DARPP-32 sur la thréonine 75, inhibant ainsi la PKA et la signalisation cellulaire qui lui est associée (Bibb *et coll.* 1999). Cdk5 peut également phosphoryler la protéine phosphatase 1 (PP1), la sous unité NR2A des récepteurs NMDA ainsi que la protéine PSD-95 (postsynaptic density protein), influençant ainsi différentes voies de signalisation intracellulaires (Bibb *et coll.* 2001b; Wang *et coll.* 2003; Morabito *et coll.* 2004). En plus de moduler le fonctionnement de diverses protéines, l'activité de Cdk5 pourrait être en étroite relation avec des changements morphologiques au niveau des neurones. En effet, il a été démontré, chez le rat, que la roscovitine, un inhibiteur de Cdk5, est capable de prévenir l'augmentation de la densité des épines dendritiques provoquée par la cocaïne dans les neurones du striatum exprimant les récepteurs dopaminergiques (Norrholm *et coll.* 2003; Fischer *et coll.* 2005).

Un autre des substrats bien connus de Cdk5 est la protéine tau (Baumann *et coll.* 1993; Paudel *et coll.* 1993), une des principales protéines impliquée dans la stabilisation des microtubules et exprimée au niveau neuronal. Lorsqu'elle devient anormalement phosphorylée, la protéine tau se détache des microtubules et provoque la désorganisation du cytosquelette des neurones, ce qui pourrait jouer un rôle important dans l'induction de dysfonctions neuronales et la neurodégénérescence (Figure 2.1). La protéine tau sera décrite ultérieurement.

La stimulation des récepteurs D2 pourrait également être impliquée dans la neurotoxicité induite par la dopamine. Par exemple, il a été démontré que, via un processus dépendant de l'activation des récepteurs D2, la dopamine induisait la mort cellulaire par apoptose dans un modèle de cellules neuronales immortalisées (Coronas *et coll.* 1997). De plus, il a été suggéré que l'effet toxique de la dopamine dans la maladie de Huntington était dépendant de l'activation des récepteurs D2 (Charvin *et coll.* 2005). Finalement, des études récentes ont suggéré un lien entre la toxicité de la dopamine et l'alpha synucléine, composante principale des corps de Lewy dans la maladie de Parkinson. En induisant des changements conformationnels de l'alpha synucléine, la dopamine empêcherait cette dernière de moduler le fonctionnement des transporteurs de la dopamine, ce qui aurait comme effet d'augmenter les niveaux extracellulaires du neurotransmetteur et de promouvoir la neurotoxicité (Sidhu *et coll.* 2004; Outeiro *et coll.* 2009).

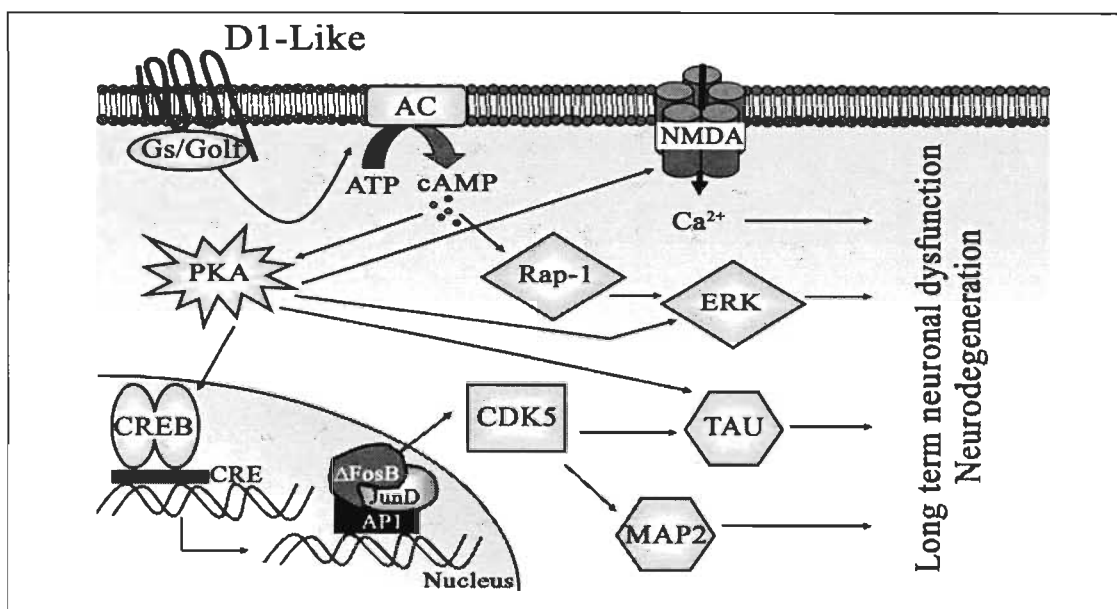


Figure 2.1 : Schéma du rôle proposé de l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 dans la dégénérescence des neurones du striatum. (Tiré de Lebel *et coll.*, Canadian Journal of Neurological Science 34 (2007) 18-29)

La toxicité induite par la signalisation des récepteurs dopaminergiques est donc un processus complexe qui peut se produire via plusieurs mécanismes et il semble que ce phénomène puisse être modulé par des modifications tant au niveau de la signalisation des récepteurs D1 que des récepteurs D2.

2.2 Dysfonctions de la transmission dopaminergique et maladie de Parkinson

C'est en 1817 que le célèbre neurologue James Parkinson publiait, pour la première fois, son essai au sujet de la « paralysie agitante » dans lequel il décrivait une maladie neurologique où les patients atteints présentaient des tremblements au repos et une forme progressive d'incapacités motrices (Parkinson 1817). Cette étude fut basée sur 6 patients dont 3 d'entre eux furent simplement rencontrés dans la rue. C'est quarante ans plus tard que Charcot donnait à ce syndrome le nom de maladie de Parkinson (Charcot 1890).

2.2.1 Étiopathologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus courante après la maladie d'Alzheimer (Bartels and Leenders 2009). Atteignant environ 0,3 % de la population en général dans les pays industrialisés, son incidence augmente après l'âge de 50 ans (Van Den Eeden *et coll.* 2003). La prévalence de la maladie de Parkinson est estimée à 1 % de la population de plus de 60 ans (Rajput 1992) et ces données augmentent à 2 % chez les personnes âgées de plus de 70 ans (Hirtz *et coll.* 2007). L'âge moyen d'apparition de la maladie se situe entre la fin de la cinquantaine et le début de la soixantaine (Lai *et coll.* 2003), toutefois chez certaines personnes où la maladie se manifeste en bas âge, les premiers symptômes peuvent se manifester entre 21 et 40 ans et peuvent même survenir avant l'âge de 20 ans (Muthane *et coll.* 1994). Heureusement, ces formes juvéniles de la maladie de Parkinson sont plutôt rares et ne touchent que 5 à 10 % des patients (Golbe 1991).

Plusieurs mécanismes, tels l'action de toxines environnementales, la neuroinflammation, les mutations génétiques, le stress oxydatif, les dysfonctions mitochondriales ou la combinaison de ces facteurs, ont été proposés à titre de facteurs étiologiques de la maladie de Parkinson (Jankovic 2002; Olanow *et coll.* 2009) mais l'hypothèse généralement acceptée est qu'elle est le résultat d'une interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux. La majorité des cas de maladie de Parkinson (80 %) sont sporadiques et qualifiés d'idiopathiques, suggérant une étiologie multifactorielle (Pollak 2004). Bien que la génétique ne semble pas être un facteur causal des formes idiopathiques (Tanner *et coll.* 1999) les descendants directs des patients parkinsoniens ont toutefois deux à trois fois plus de chances d'en être atteints (Gasser 1998). Seulement 5 à 10 % des cas de maladie de Parkinson sont attribuables à des facteurs purement génétiques (Vila and Przedborski 2004) et certains gènes tels l'alpha-synucleine, LRRK2, PARKIN, PINK1 et DJ1 ont été identifiés pour être impliqués dans la forme familiale de la maladie de Parkinson (Kitada *et coll.* 1998; Polymeropoulos 2000; Lucking *et coll.* 2000; Abou-Sleiman *et coll.* 2003; Valente *et coll.* 2004; Funayama *et coll.* 2005).

L'hypothèse de l'implication de facteurs environnementaux dans la maladie de Parkinson a vu le jour suite à l'observation, en Californie, de syndromes extrapyramidaux sévères semblables à ceux éprouvés par les patients parkinsoniens chez des toxicomanes fabriquant eux même l'agent hallucinogène qu'ils consommaient. L'analyse de ce produit a permis l'identification d'un contaminant dans la drogue responsable de l'apparition du syndrome; il s'agissait du 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine communément appelé MPTP. C'est en 1983 que Langston exposa le fait qu'une toxine comme le MPTP, s'accumulant dans les neurones dopaminergiques et provoquant leur mort, pouvait induire un syndrome très similaire à celui de la maladie de Parkinson (Langston *et coll.* 1999), supportant grandement l'hypothèse que des toxines exogènes pouvaient être en cause. De plus, le paraquat et la roténone, deux pesticides ayant des structures chimiques similaires au MPTP et ayant été largement utilisés, ont également été reconnus

pour induire la perte de neurones dopaminergiques ainsi que des déficits moteurs et l'apparition de corps de Lewy, supportant encore une fois l'hypothèse de l'implication de toxines environnementales dans l'étiologie de la maladie de Parkinson (Betarbet *et coll.* 2000; Sherer *et coll.* 2001; McCormack et Di Monte 2003). Les mécanismes exacts par lesquels ces toxines induisent des dommages aux neurones dopaminergiques ne sont pas totalement élucidés, mais il semble que leur sélectivité pour ces neurones et leur capacité d'inhiber le complexe 1 de la chaîne de transport des électrons des mitochondries soient impliqués (Nicklas *et coll.* 1992; Betarbet *et coll.* 2000). Il est intéressant de noter que le complexe 1 de la chaîne de transport des électrons est également affecté dans la majorité des cas idiopathiques de la maladie de Parkinson (Parker *et coll.* 1989).

Une autre hypothèse proposée est celle du stress oxydatif. Une explication possible serait la présence d'une déficience au niveau du système responsable de la dégradation des produits du métabolisme de la dopamine, ce qui a été démontré chez plusieurs patients parkinsoniens. Par exemple, une diminution du glutathion, un antioxydant majeur des cellules, a été observée dans la substance noire des patients parkinsoniens (Sian *et coll.* 1994) et corrèle avec une augmentation de la production de radicaux libres, induisant des dommages aux neurones dopaminergiques (Jenner et Olanow 1996). De plus, l'activation des cellules gliales, se produisant lors de la neuroinflammation fréquemment observée dans la maladie de Parkinson, pourrait également être responsable du maintien et de l'amplification des dommages neuronaux par le biais de la production d'une grande quantité de radicaux libres et autres substances neurotoxiques (McGeer et McGeer 2004).

Les phénomènes d'excitotoxicité ont longtemps été suspectés pour être impliqués dans la maladie de Parkinson (Beal 1998) mais étaient jusqu'ici considérés comme une conséquence tardive des dommages cellulaires induits par d'autres processus neurotoxiques. Une hypothèse récente suggère plutôt que le stress métabolique induit par le calcium serait à la base des phénomènes

de neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson (Chan *et coll.* 2009; Surmeir *et coll.* 2010). L'activité autonome des neurones dopaminergique de la SNc, via l'activation des sous-unités Cav1.3 des canaux calciques de type L, ayant comme conséquence l'élévation importante des niveaux de calcium intracellulaire (Chan *et coll.* 2007), résulterait en une amplification de l'activité métabolique afin de maintenir l'homéostasie ce qui compromettrait la protéostasie ainsi que les défenses oxydatives de la cellule (Surmeier *et coll.* 2010). Les phénomènes d'excitotoxicité seraient alors responsables de la vulnérabilité sélective des neurones dopaminergiques plutôt que d'en être une conséquence tardive. De plus, les mutations génétiques ainsi que les facteurs environnementaux pourraient avoir un effet synergique au stress métabolique, accélérant ainsi les phénomènes de neurodégénérescence (Surmeier *et coll.* 2010).

Une diminution de l'activité des systèmes ubiquitine-protéasomes, impliqués dans la dégradation de protéines non fonctionnelles dans le cerveau, a également été proposée à titre de mécanisme impliqué dans la maladie de Parkinson. Pour des raisons génétiques, par exemple des mutations dans les gènes de la Parkin ou de l'Ubiquitine C (Kitada *et coll.* 1998; Leroy *et coll.* 1998), ou encore suite à des dommages causés par des toxines environnementales neutralisant des protéines comme l'alpha-synucéine (Di Monte 2003), l'incapacité du système ubiquitine-protéasome de se débarrasser des protéines indésirables du cerveau serait associée à l'apparition de la maladie de Parkinson (McNaught et Olanow 2003).

2.2.2 Physiopathologie de la maladie de Parkinson

C'est plus de 100 ans après la première description de la maladie de Parkinson, soit en 1919, qu'il fût démontré pour la première fois que les patients atteints de cette maladie subissaient une importante perte de cellules dans le cerveau. De nos jours, il est clairement établi que la principale caractéristique biochimique associée à l'apparition de la maladie de Parkinson est la dégénérescence

massive et progressive des cellules du cerveau produisant la dopamine dans la substance noire compacte. Bien que cette région du cerveau soit particulièrement affectée, des pertes neuronales sont également observées au niveau du locus coeruleus, du globus pallidus et du noyau du raphé chez les patients parkinsoniens (Defebvre 2007). Au niveau périphérique, des neurones dopaminergiques de la région fovéale de la rétine et de la paroi du tube digestif peuvent également être affectés dans la maladie de Parkinson (Defebvre 2007). En plus de la perte neuronale, la présence de Corps de Lewy, inclusions éosinophiles intraneuronales formées de dépôts anormaux d'alpha-synucléine, est une des caractéristiques pathologiques permettant le diagnostic de la maladie de Parkinson (Hornykiewicz 1998; Gelb *et coll.* 1999).

Bien qu'affectant d'autres systèmes de neurotransmission tels les systèmes cholinergiques, noradrénergiques, sérotoninergiques et peptidergiques (Jellinger 1991), la perte neuronale dans la maladie de Parkinson touche essentiellement le système dopaminergique et plus particulièrement la partie caudale et ventro-latérale de la substance noire compacte (Defebvre 2007). Comme les neurones de cette région du cerveau, produisant la dopamine, projettent vers le striatum, il en résulte donc une diminution importante des niveaux de dopamine dans le caudé et le putamen. Conséquemment, les patients parkinsoniens sont aux prises avec une perte progressive de la capacité à initier et à exécuter des mouvements moteurs volontaires puisque la dopamine est responsable de l'intégration des informations reçues au striatum via les aires motrices, sensibles et frontales du cortex et est également à la base de l'exécution de comportements moteurs appropriés (Grace 2008). C'est donc suite à la raréfaction de la dopamine qu'apparaissent les symptômes moteurs incontrôlés bien connus de la maladie de Parkinson soit les tremblements au repos, la lenteur des mouvements ou bradykinésie et la rigidité musculaire qui seront décrits plus loin.

En se référant au modèle classique des voies de signalisation directes et indirectes prenant naissance au niveau du striatum, une déficience en dopamine provoque une diminution de l'effet excitateur du neurotransmetteur sur la voie directe inhibitrice entre le striatum et le GPi. Parallèlement, l'effet inhibiteur de la dopamine sur la voie indirecte, projetant vers le GPi via un relais par le GPe et le STN, est également diminué. Les principales conséquences sont donc une diminution marquée de l'influence inhibitrice GABAergique des structures efférentes des ganglions de la base, soit le GPi et la SNr, en provenance de la voie directe ainsi qu'une augmentation marquée de l'influence excitatrice glutamatergique sur ces structures. Il en résulte une inhibition tonique du thalamus et par le fait même une diminution de l'influence excitatrice glutamatergique exercée sur le cortex moteur à la base de la symptomatologie parkinsonienne (Figure 2.2) (Hirsch *et coll.* 2000; Whone *et coll.* 2003a; Cenci 2007; Defebvre 2007).

2.2.3 Les symptômes associés à la maladie de Parkinson

2.2.3.1 La triade de symptômes moteurs

Tel que mentionné précédemment, la maladie de Parkinson est caractérisée par une triade de symptômes moteurs comprenant les tremblements au repos, la bradykinésie et la rigidité musculaire.

Un autre symptôme a été associé à la maladie de Parkinson: l'instabilité posturale. Lorsque les symptômes moteurs sont visibles en clinique, plus de 80 % de la dopamine striatale est absente et 50 % des neurones de la substance noire ont déjà été détruits (Kish *et coll.* 1988; Scherman *et coll.* 1989; Fearnley et Lees 1990; Hornykiewicz 1998; Ahlskog et Muenter 2001).

Les tremblements au repos sont l'un des symptômes moteurs les plus communs et les plus facilement identifiables de la maladie de Parkinson.

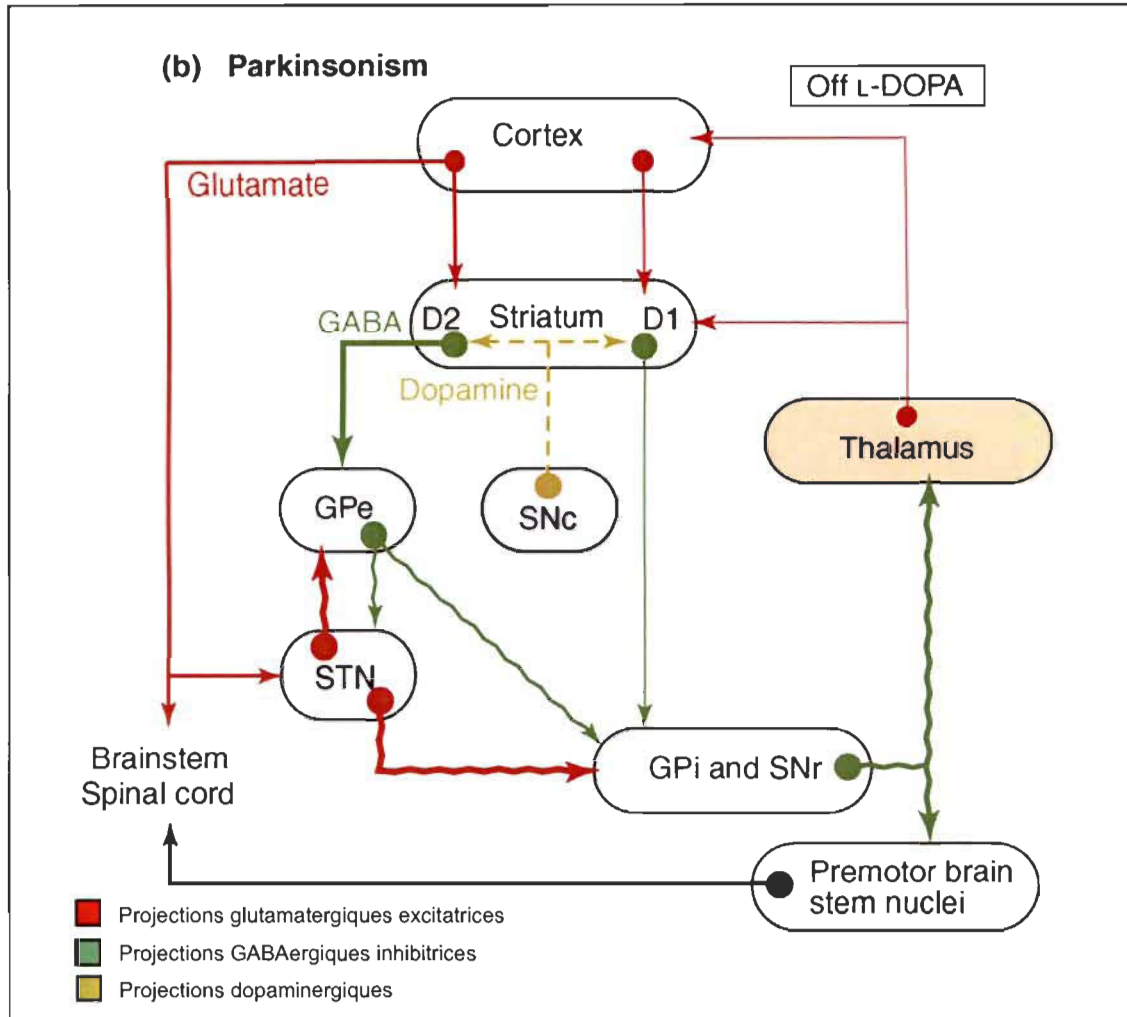


Figure 2.2 : Schéma de la répercussion de la raréfaction de la dopamine striatale sur les circuits thalamo-corticaux des ganglions de la base (Tiré de Cenci A. Trends in Neuroscience 30 (2007) 236-243)

Apparaissant souvent d'un seul côté du corps, celui qui est le plus atteint, les tremblements peuvent devenir bilatéraux avec l'évolution de la maladie. Ils affectent principalement la partie distale des extrémités, le plus souvent les membres supérieurs et plus particulièrement la main ou encore un ou plusieurs doigts dans des mouvements de pronosupination. Les tremblements peuvent également affecter les membres inférieurs, touchant davantage le pied ou les orteils, ou atteindre les lèvres, le menton ou la mâchoire (Jankovic 2002). Il est important de noter que les tremblements parkinsoniens apparaissent ou

s'aggravent au repos et en situation de stress émotionnel et cessent totalement, la plupart du temps, dès l'initiation d'un mouvement ou même lorsque la décision de bouger est prise (Pollak 2004). L'apparition des tremblements au repos est variable selon les patients et l'évolution de la maladie. Des études rapportent que 69 % des patients parkinsoniens présentent des tremblements au repos au début de la maladie et que 75 % des patients en souffrent en cours de maladie (Hughes *et coll.* 1993).

La bradykinésie, quant à elle, se définit comme étant la lenteur d'exécution d'un mouvement (Jankovic 2002). En temps normal, les mouvements sont fluides, sans effort apparent, car les muscles reçoivent les informations adéquates en provenance du cerveau. Par contre, chez les patients parkinsoniens, il y a une perte graduelle de la capacité à planifier, initier et exécuter des mouvements moteurs volontaires, témoignant de dysfonctions dans les circuits moteurs des ganglions de la base (Jankovic 2002; Pollak 2004). La bradykinésie est le symptôme démontrant la plus forte corrélation avec la déficience en dopamine (Vingerhoets *et coll.* 1997) et se manifeste souvent par des difficultés à réaliser des tâches de tous les jours, incluant les mouvements exigeant une certaine dextérité tels que boutonner ses vêtements. Les patients parkinsoniens éprouvent fréquemment de la difficulté à marcher normalement et le font souvent à petits pas afin de retrouver leur centre d'équilibre: c'est ce qu'on appelle la festination. Ils perdent également la capacité de réaliser plusieurs petits mouvements, tels que cligner des yeux, avaler leur salive ou balancer les bras en marchant. La voix diminue et devient monotone, les mots sont mal articulés et les patients développent un trouble du langage appelé palilalie. La bradykinésie peut être atténuée ou même disparaître au réveil et est dépendante de l'état émotionnel du patient (Jankovic 2002; Pollak 2004). En effet, en état de stress, un patient parkinsonien peut être en mesure d'effectuer des mouvements rapides comme par exemple courir. Ce phénomène, appelé akinésie paradoxale, suggère que les patients parkinsoniens ne sont pas affectés de problèmes de programmes moteurs, mais qu'ils ont plutôt des difficultés à y accéder sans stimuli externes (Jankovic 2002).

La rigidité musculaire, souvent appelée hypertonie, est la conséquence d'une insuffisance du relâchement musculaire. Les patients qui en sont atteints souffrent de raideurs, de tensions musculaires et d'engourdissements qui peuvent même devenir douloureux. Elle affecte principalement la colonne vertébrale, la racine des membres, le dos, la nuque et les épaules et l'hypertonie peut parfois même être visuellement observable. La douleur aux épaules est l'une des premières et plus fréquentes manifestations de la maladie de Parkinson, bien qu'elle soit souvent diagnostiquée, à tort, comme étant de l'arthrite ou une bursite (Stamey *et coll.* 2008). La rigidité est responsable de la posture caractéristique des patients parkinsoniens, le buste penché vers l'avant, le dos voûté, le regard dirigé vers les pieds, les bras collés au corps et les genoux fléchis. Comme tous les autres symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, la rigidité musculaire est associée au stress émotionnel et s'accroît lors de la réalisation d'un mouvement.

L'existence de différents profils symptomatiques propres à chacun des sujets atteints de la maladie de Parkinson reflète une grande diversité dans la nature des lésions pouvant affecter le système moteur (Jankovic 2002; Pollak 2004).

2.2.3.2 Autres symptômes de la maladie de Parkinson

En plus des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie de Parkinson, les patients sont également susceptibles d'être atteints d'autres symptômes regroupés sous trois grandes catégories : les symptômes cognitifs, végétatifs et perceptifs. Ils se présentent sous forme de troubles psychologiques et comportementaux, de dysfonctions du système autonome ainsi que des désordres sensitifs et troubles du sommeil. Ces symptômes peuvent survenir dans les stades avancés de la maladie, mais s'observent, le plus souvent, jusqu'à une décennie avant l'expression des symptômes moteurs (Chaudhuri et Schapira 2009).

Les désordres cognitifs peuvent être tout aussi invalidants que les symptômes moteurs dans la maladie de Parkinson. Dans une étude, 84 % des patients évalués présentaient des désordres cognitifs et 48 % rencontraient les critères de la démence après 15 ans de suivi (Hely *et coll.* 2005). La dépression, l'apathie, l'anxiété et les hallucinations sont les symptômes qui ont été les plus fréquemment rapportés (Aarsland *et coll.* 2007). Des troubles obsessifs-compulsifs et des comportements impulsifs ont également été observés tels la boulimie, l'hypersexualité, la suralimentation, le jeu et les achats compulsifs. Ces symptômes ont été associés à des dysfonctions dans la recapture et le métabolisme de la dopamine centrale (Rinne *et coll.* 2000; Lewis *et coll.* 2003). Il est important de noter que l'apparition de certains troubles survient suite au traitement de la maladie de Parkinson. C'est le cas par exemple des troubles compulsifs ainsi que des troubles du sommeil qui accompagnent fréquemment le traitement avec des agonistes dopaminergiques (Wood 2010).

Les dysfonctions végétatives, quant à elles, comprennent les troubles vasculaires tels l'hypertension ou l'hypotension orthostatique, l'œdème des membres inférieurs, les troubles digestifs tels l'hypersalivation, les troubles génito-urinaires comme la constipation, les troubles de miction, les dysfonctions sexuelles et les troubles cutanés tels rougeurs de la peau, sudation excessive et des excès de sébum produisant des dermatites. (Jankovic 2002; Pollak 2004).

De leur côté, les désordres perceptifs ou sensitifs se manifestent souvent par des troubles comme les fourmillements (paresthésie), le besoin de bouger les membres inférieurs (akathisie) et la diminution de la perception des odeurs (hyposmie). Ce dernier symptôme a d'ailleurs été proposé à titre de marqueur précoce de la maladie de Parkinson (Ponsen *et coll.* 2004). L'hyposmie, affectant de plus de 70% des patients parkinsoniens, serait associée entre autres à des pertes de neurones dopaminergiques dans le bulbe olfactif (Herting *et coll.* 2008). Une autre forme de trouble perceptif est le trouble du sommeil. Bien qu'étant fréquemment associés à la médication utilisée par les patients parkinsoniens, les troubles du sommeil sont désormais reconnus pour faire

partie intégrale de la maladie de Parkinson. Des symptômes comme des anomalies dans la phase du sommeil associée aux mouvements rapides des yeux (Rapid eye movement sleep behavior disorder (RBD)) se produisent chez le tiers des patients et sont maintenant considérés comme un état pré-parkinsonien (Gagnon *et coll.* 2006). L'insomnie et le sommeil fragmenté sont également observés chez plus de la moitié des personnes atteintes (Gjerstad *et coll.* 2007).

Plusieurs symptômes, susceptibles de mener à des diagnostics erronés, peuvent donc être observés dans la maladie de Parkinson. Toutefois, l'apparition insidieuse de divers symptômes non moteurs a contribué à l'élaboration de nouveaux concepts concernant la compréhension des phénomènes de neurodégénérescence associés à cette maladie. En effet, des chercheurs ont émis l'hypothèse que, comme les symptômes non-moteurs précédaient fréquemment l'apparition des troubles moteurs, la dégénérescence cellulaire pourrait débuter dans le système nerveux autonome et par la suite atteindre le système nerveux central, plus particulièrement la substance noire compacte, expliquant alors l'apparition plus tardive des symptômes moteurs (Przuntek *et coll.* 2004).

2.2.4 Traitements actuels de la maladie de Parkinson

Étant donné que la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la maladie de Parkinson est incomplète, les traitements antiparkinsoniens disponibles à ce jour ne sont efficaces que pour atténuer les symptômes de la maladie. Toutefois, ces médicaments améliorent grandement la qualité de vie et les capacités fonctionnelles des patients qui en sont atteints. La stratégie thérapeutique des agents antiparkinsoniens repose principalement sur l'utilisation de molécules dopaminomimétiques capables de normaliser les niveaux de dopamine au cerveau et de restaurer la transmission dopaminergique au striatum. Les médicaments utilisés agissent soit en majorant directement les taux de dopamine, comme c'est le cas de la L-DOPA, soit en

stimulant directement les récepteurs comme le font les agonistes dopaminergiques ou en réduisant la dégradation de la dopamine par l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes impliqués dans son métabolisme. Le choix du traitement à privilégier dépend de plusieurs facteurs incluant l'âge du patient, le stade de la maladie, les niveaux d'incapacités fonctionnelles, le statut cognitif ainsi que les effets secondaires associés à l'utilisation du médicament.

2.2.4.1 La 3,4-dihydroxyphénylalanine ou L-DOPA

La capacité de la L-DOPA à améliorer les symptômes moteurs dans la maladie de Parkinson fut démontrée pour la première fois en 1961 et c'est plus tard au cours de cette décennie qu'ont été développées les formes orales de L-DOPA (Birkmayer et Hornykiewicz 1961). Ce médicament est donc utilisé depuis plus de 40 ans et est encore aujourd'hui le médicament le plus utilisé et le plus efficace pour atténuer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson.

La L-DOPA est le précurseur naturel la dopamine qui, contrairement au neurotransmetteur, est capable de traverser la barrière hématoencéphalique (Olanow et Koller 1998). Ayant un temps de demi-vie très court, soit d'environ une heure et demie (Ball 2001), la L-DOPA atteint le pic plasmatique à jeun en moyenne de une à deux heures après l'ingestion et doit donc être administrée de façon répétée. Sa résorption digestive s'effectue essentiellement au niveau du duodénum et est limitée par de nombreux facteurs tels la prise de nourriture, l'utilisation d'anticholinergiques, l'acidité gastrique, la décarboxylation au niveau de la paroi de l'estomac et les mécanismes de compétition avec d'autres acides aminés partageant les mêmes mécanismes de transport (Montastruc *et coll.* 1990).

La L-DOPA, si elle était administrée seule, verrait seulement 1 % de la dose ingérée être en mesure de se rendre au cerveau dû à la rapidité avec laquelle elle est décarboxylée en dopamine à la périphérie (Nutt et Fellman 1984). C'est la raison pour laquelle un inhibiteur de la dopa-décarboxylase est administré en

association avec la L-DOPA, lui fournissant ainsi un meilleur profil thérapeutique. En plus d'empêcher la décarboxylation périphérique de la L-DOPA, permettant ainsi l'utilisation de doses de 60 à 80 % plus faibles, les inhibiteurs de la dopa-décarboxylase atténuent les symptômes périphériques provoqués par l'administration de la L-DOPA soit les nausées, les vomissements et l'anorexie (Nutt et Fellman 1984; Cedarbaum 1987; Jankovic 2002). L'administration de benserazide ou de carbidopa, ne traversant pas la barrière hématoencéphalique aux doses utilisées, en combinaison avec la L-DOPA, permet de prévenir son catabolisme périphérique et de multiplier par un facteur 10 la quantité de L-DOPA disponible dans le système nerveux central (Cedarbaum 1987).

Bien entendu, le fait d'empêcher la décarboxylation de la L-DOPA dirige celle-ci vers son métabolisme en 3-O-methyldopa (3-OMD) par les catéchol-O-méthyltransférases (COMT) et provoque une augmentation de 3-OMD à la périphérie (Nutt et Fellman 1984). Ce métabolite constitue un inhibiteur compétitif du transport actif de la L-DOPA à travers la barrière hématoencéphalique (Nutt et Fellman 1984; Mannisto et Kaakkola 1989). L'utilisation de l'entacapone ou de la tolcapone, inhibiteurs de la COMT périphérique, en combinaison avec la L-DOPA et les inhibiteurs de la dopa-décarboxylase, permet une amélioration significative de la biodisponibilité de la L-DOPA centrale et une diminution de l'accumulation de 3-OMD périphérique. L'addition de ces composés a permis d'accroître la période de temps pendant laquelle le patient est en mesure d'effectuer des mouvements moteurs (« on » time) et par le fait même de diminuer les périodes où le patient est immobilisé (« off » time), en plus de prolonger la durée de la réponse à la L-DOPA et de diminuer les doses quotidiennes administrées (Roberts *et coll.* 1993; Baas *et coll.* 1997).

Au cerveau, la L-DOPA est prise en charge par les neurones dopaminergiques restants, jusqu'ici épargnés lors de l'évolution de la maladie de Parkinson, mais également au niveau des cellules gliales et des neurones sérotoninergiques. Elle est alors transformée en dopamine grâce à la dopa-décarboxylase et

emmagasinée dans des vésicules pré-synaptiques puis relâchée lentement dans la synapse où elle ira se fixer sur les récepteurs dopaminergiques de l'élément post-synaptique. À ce niveau, la L-DOPA agit sur les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 et active les voies de signalisation intracellulaires qui leur sont rattachées (voir figure 1.5). Après avoir fait son effet, la dopamine est en grande partie recaptée, via les transporteurs de la dopamine, puis emmagasinée dans des vésicules ou encore métabolisée dans la terminaison neuronale. Comme la baisse des niveaux de dopamine dans le striatum est la principale cause de l'apparition des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, l'administration de L-DOPA, au début du traitement, permet un contrôle très efficace de ces derniers: c'est ce qu'on appelle la lune de miel. Malheureusement, avec l'évolution de la maladie, de moins en moins de neurones dopaminergiques survivent, ce qui se traduit par des difficultés dans la conversion, l'emmagasinement et la relâche de la dopamine (Olanow *et coll.* 2006), diminuant ainsi le bénéfice thérapeutique de la L-DOPA. À partir de ce moment, les niveaux de dopamine fluctuent dans la synapse, reflétant les niveaux de L-DOPA périphériques: les patients doivent alors utiliser des doses plus élevées de L-DOPA afin de démontrer une réponse clinique (Olanow *et coll.* 2006). À ce stade, les sujets perçoivent le moment où la L-DOPA commence son effet, mais également le moment où celui-ci se termine : ce sont les détériorations de fin de doses ou « wearing-off ». La diminution de l'efficacité thérapeutique de la L-DOPA pourrait être associée à des modifications présynaptiques, dues à la perte des neurones dopaminergiques, mais elle pourrait également être associée à des dysfonctions post-synaptiques. En effet, il a été démontré, chez le singe MPTP (décrit à la section 3.1), que l'administration d'agonistes dopaminergiques agissant indépendamment de l'élément pré-synaptique pourrait également induire, à long terme, une diminution du temps de réponse comparable à celle observée lors de l'utilisation de la L-DOPA (Blanchet *et coll.* 1996).

Le bénéfice thérapeutique de la L-DOPA est malheureusement associé, à long terme, à l'apparition de complications motrices importantes qui seront discutées

dans la prochaine section. Pour cette raison, de nouvelles formulations de L-DOPA, potentiellement susceptibles de prodiguer une stimulation continue des récepteurs dopaminergiques, sont présentement sous investigation. Il s'agit par exemple, de formulations de timbres transdermiques, d'infusions duodénales continues et de formules orales à libération prolongée ayant tous pour objectif de développer un traitement antiparkinsonien efficace et d'éviter l'apparition des complications motrices (Hauser 2009). Bien que ces traitements semblent prévenir l'apparition des dyskinésies, certaines de ces formulations ne seraient pas aussi efficaces que la L-DOPA dans la prévention des symptômes parkinsoniens (Pezzoli et Zini 2010).

2.2.4.2 Les agonistes dopaminergiques

Plusieurs options de traitements antiparkinsoniens sont devenues accessibles dans les dernières années, menant à l'amélioration du contrôle des mouvements moteurs dans les stades précoces et avancés de la maladie (Antonini et Barone 2008). Bien que controversée, l'utilisation d'agonistes dopaminergiques, agissant directement sur les récepteurs, semble représenter une option thérapeutique intéressante pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. Présentant généralement un temps de demi-vie plus long que la L-DOPA, les agonistes dopaminergiques sont susceptibles de réduire, ou du moins retarder, le risque d'apparition des fluctuations motrices (Whone *et coll.* 2003b; Suchowersky *et coll.* 2006).

Agissant principalement sur les récepteurs D2-Like, l'effet antiparkinsonien des agonistes dopaminergiques est attribuable à la stimulation des récepteurs D2 post-synaptique (Deleu *et coll.* 2002). Certains agonistes présentent également des affinités pour d'autres sous-types de récepteurs dopaminergiques, par exemple les récepteurs D1 ou D3, ou encore une spécificité pour des récepteurs d'autres neurotransmetteurs, expliquant les différences dans leur efficacité et les effets secondaires qu'ils provoquent.

Deux principales catégories d'agonistes dopaminergiques sont disponibles pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson : les ergolines, dérivés de l'ergot de seigle, et les non ergolines (Hurley et Jenner 2006). Dans la première catégorie, on retrouve la bromocriptine, un agoniste des récepteurs D2 présentant un faible effet antagoniste des récepteurs D1 (Rascol et Montastruc 2000). Bien qu'ayant un temps de demi-vie beaucoup plus élevé que la L-DOPA, soit de 10 heures, la bromocriptine posséderait une efficacité antiparkinsonienne inférieure à la L-DOPA. Le Lisuride, un agoniste D2 avec un temps de demi-vie d'environ deux heures, démontrerait une efficacité antiparkinsonienne comparable à la bromocriptine. Le pergolide, un agoniste D1 et D2 ainsi que la cabergoline, un agoniste sélectif des récepteurs D2, font également partie des médicaments dérivés de l'ergot de seigle. Dans la seconde catégorie, les molécules non ergolines, on retrouve le ropinirole, un agoniste sélectif des récepteurs D2-Like démontrant une affinité supérieure pour les récepteurs D3 que pour les récepteurs D2, qui présenterait une efficacité antiparkinsonienne comparable à celle de la L-DOPA dans les stades précoces de la maladie (Rascol 1999). Le pramipexole, également un agoniste D2-Like, et le piribedil, un agoniste des récepteurs D2, sont également disponibles. L'apomorphine, malgré le fait qu'elle a un temps de demi-vie très court (environ une heure) demeure le plus puissant agoniste dopaminergique disponible à ce jour. Agissant sur les récepteurs D1 et D2, l'apomorphine est utilisée dans le traitement des fluctuations motrices causées par la dopathérapie. Les agonistes dopaminergiques non-ergolines sont des médicaments antiparkinsoniens très efficaces et qui sont moins susceptibles d'induire des complications motrices : c'est pourquoi ils sont souvent le traitement de première intention chez les patients de moins de 55 ans. Toutefois, à long terme, la L-DOPA doit être introduite afin de pallier à la baisse d'efficacité de ces traitements (Lees 2005).

Les agonistes dopaminergiques à effets centraux provoquent tous l'apparition d'effets indésirables communs, dont les plus fréquents sont la somnolence et les troubles digestifs. Toutefois, la fréquence et l'intensité des effets secondaires diffèrent selon les produits et la durée de traitement. Il n'y a pas de consensus à

l'effet de déterminer si les agonistes dopaminergiques doivent être introduits au début de la maladie afin de retarder l'introduction de la L-DOPA et l'apparition des effets secondaires ou encore plus tard dans l'évolution de la maladie, lorsque l'efficacité de la L-DOPA diminue (Movement Disorder Society 2002).

2.2.4.3 Les inhibiteurs de la monoamine oxydase

La MAO est une enzyme mitochondriale catalysant la dégradation des monoamines et des catécholamines (Youdim 1975). Présente sous deux isoformes dans les tissus des mammifères, la MAO-A et la MAO-B jouent un rôle central dans la dégradation de la dopamine. La dopamine est métabolisée par des MAO intraneuronales (MAOA) et des MAO présentes dans les cellules gliales et les astrocytes (MAOA et MAOB). Des études cliniques évaluant l'efficacité d'inhibiteurs non sélectifs des MAO ont révélé l'apparition de graves crises hypertensives (Gunn *et coll.* 1989; Yamada et Yasuhara 2004) justifiant la mise au point d'inhibiteurs sélectifs de cette enzyme. Inhibant seulement l'isoforme B de la MAO, la sélégiline est l'inhibiteur le plus utilisé pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. Toutefois, la rasagiline et le lazabémide sont d'autres inhibiteurs de la MAOB couramment utilisés. Le ladostigil, quant à lui, combine plusieurs effets thérapeutiques puisqu'en plus de démontrer des effets neuroprotecteurs (Bar-Am *et coll.* 2009), il possède des propriétés d'inhibiteur des MAOA et MAOB spécifiques du cerveau et également un effet inhibiteur de cholinestérase, ce qui expliquerait son efficacité sur l'amélioration des performances motrices des patients parkinsoniens (Youdim *et coll.* 2006) (Figure 2.3).

2.2.4.4 L'amantadine

L'amantadine est un agent antiviral dont l'efficacité antiparkinsonienne a été découverte par hasard en 1998 (Korczyn *et coll.* 1998). Plusieurs mécanismes d'action de cette molécule ont été proposés pour expliquer son efficacité sur les symptômes parkinsoniens : augmentation de la relâche de dopamine, inhibition

de sa recapture à fortes doses, faible effet antimuscarinique (Metman *et coll.* 1999) et antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA (Stoof *et coll.* 1992), influençant donc la transmission glutamatergique.

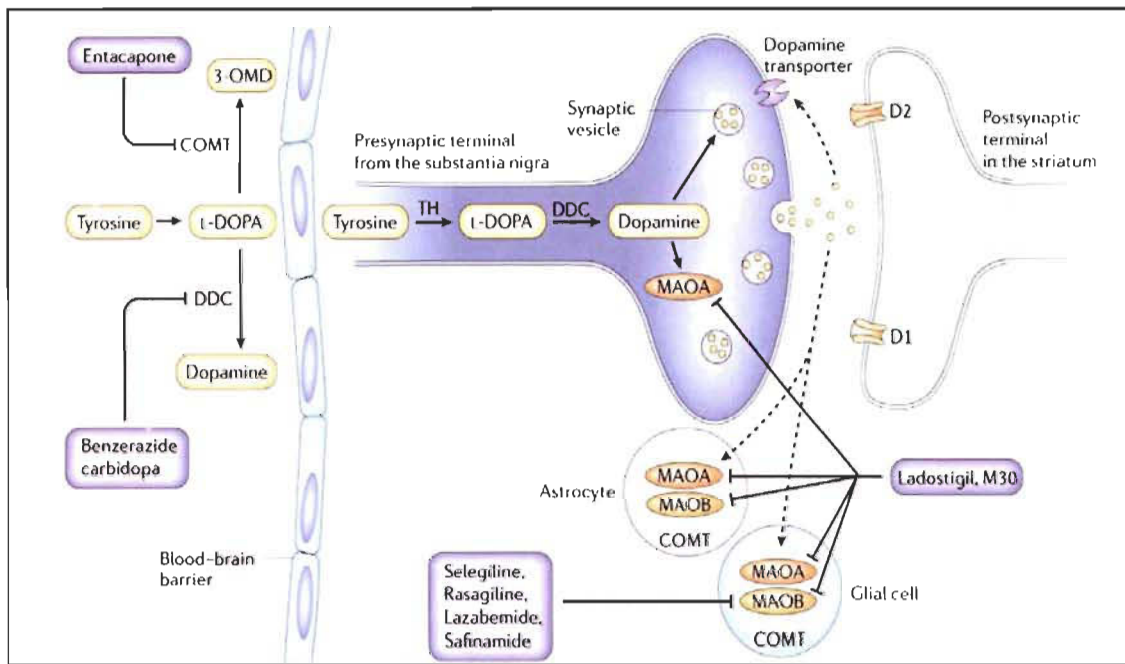


Figure 2.3 : Représentation schématique du fonctionnement d'inhibiteurs de la MAO utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson (Tiré de Youdim *et coll.*, Nature Reviews Neuroscience 7 (2006) 295-309)

L'amantadine, bien que présentant une activité antiparkinsonnienne légère, améliore davantage l'akinésie et la rigidité que les tremblements au repos. Elle possède également une efficacité sur les fluctuations motrices de fin de dose due à son effet antiglutamatergique (Metman *et coll.* 1999; Snow *et coll.* 2000; Del Dotto *et coll.* 2001; da Silva-Junior *et coll.* 2005).

2.2.4.5 Les anticholinergiques

Les médicaments anticholinergiques, utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson, sont principalement des molécules anti-muscariniques. Ils agiraient en corrigeant les déséquilibres entre les systèmes dopaminergiques et cholinergiques dans le striatum provoqués par la dénervation dopaminergique.

D'autres anticholinergiques auraient des effets antagonistes sur les récepteurs NMDA (Deleu *et coll.* 2002). Les principales drogues anticholinergiques utilisées sont le bantzopine, le trihexyphenidyl, l'orphenadrine et la procyclidine. Ils présenteraient une efficacité moyenne sur les tremblements parkinsoniens et leur utilisation est limitée par les effets secondaires importants qu'ils provoquent: le déclin des fonctions neuropsychiatriques et cognitives (Yuhan *et coll.* 2010).

Plusieurs écoles de pensées existent quant au traitement antiparkinsonien de première intention à utiliser. Certains avancent que la L-DOPA devrait être introduite en début de traitement, peu importe l'âge du patient (Lees 2005). Souvent, la combinaison de différents agents thérapeutiques, par exemple les inhibiteurs de COMT ou de MAOB en association avec la L-DOPA peut aider à retarder l'apparition de « wearing-off » et la substitution partielle de la L-DOPA par les agonistes dopaminergiques peut être une stratégie intéressante afin de repousser l'induction des dyskinésies (Hauser et Zesiewicz 2007).

2.2.4.6 Perspectives futures

Les traitements chirurgicaux des symptômes parkinsoniens par implantation d'électrodes consistent à envoyer une impulsion électrique au niveau du thalamus, du noyau sous-thalamique ou du globus pallidus afin de rétablir le fonctionnement normal du système. Ce genre de traitements, jusqu'à présent utilisés que chez les patients qui ne répondent pas adéquatement à la médication, permettent une diminution marquée des symptômes parkinsoniens tout en évitant l'apparition des fluctuations motrices (Yuan *et coll.* 2010). Toutefois, ils sont associés à des effets secondaires majeurs tels les dysfonctions cognitives, la dépression, l'hypersexualité et les hallucinations (Kluger *et coll.* 2009).

La greffe de cellules fœtales, consistant à injecter des cellules dopaminergiques mésencéphaliques dans les striatum de patients parkinsoniens, permettrait la libération physiologique de neurotransmetteur à long terme. Cette technique a

toutefois été délaissée principalement à cause de la faible disponibilité des cellules foétales et de la nécessité d'immunodépression des patients subissant l'intervention.

D'autres initiatives thérapeutiques incluant la thérapie génique, la stimulation profonde du noyau pédoculo-pontin, l'utilisation de la mémantine et des antagonistes des récepteurs adénosine A2A sont présentement sous investigation. De plus, de nouvelles molécules comme des antagonistes sélectifs des récepteurs glutamatergiques agissant sur les récepteurs 5-hydroxytryptamine (5-HT) 2A et des formulations de L-DOPA à effet prolongé sont présentement à l'étude (Lees 2005; Hauser et Zesiewicz 2007).

2.3 Dysfonctions de la transmission dopaminergique et les complications motrices de la dopathérapie

Malgré le fait que la L-DOPA demeure le médicament de choix pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson, il n'en demeure pas moins que l'utilisation chronique de ce composé initie une cascade complexe d'évènements cellulaires et moléculaires provoquant l'apparition d'effets secondaires importants limitant son utilisation (Obeso *et coll.* 2000a). Le bénéfice thérapeutique du médicament s'estompe progressivement avec le temps et laisse place à l'apparition de mouvements moteurs involontaires chez la plupart des patients parkinsoniens après cinq à dix ans de traitements (Ahlskog et Muenter 2001), ce qui constitue une source de gêne fonctionnelle considérable. Les complications motrices provoquées par la dopathérapie comprennent les fluctuations motrices qui se définissent comme la résurgence des signes parkinsoniens due à la diminution de la période de temps durant laquelle le médicament procure un bénéfice clinique, et les dyskinésies induites par la L-DOPA, qui sont des mouvements involontaires anormaux s'ajoutant aux fluctuations motrices (Defebvre 2007).

2.3.1 Les fluctuations motrices

Au début de la maladie, le traitement à la L-DOPA procure une amélioration marquée, voire même une disparition complète, des symptômes parkinsoniens. Reconnue pour avoir un effet rapide de courte durée (1-4 heures) et un effet lent de plus longue durée (3 à 5 jours) (Kaye et Feldman 1986), la L-DOPA administrée de trois à quatre fois par jour permet aux patients en début de traitement de bénéficier d'un contrôle très satisfaisant de leurs symptômes sans expérimenter de fluctuations motrices. Dans les faits, les fluctuations motrices débutent dès l'initiation du traitement dopaminomimétique (Nutt et Holford 1996) mais la faible sévérité des symptômes et la réponse prolongée aux médicaments masque ces fluctuations. Avec le temps et l'évolution de la maladie, la disparition de la réponse à long terme, additionnée à une baisse progressive de la réponse à court terme, fait en sorte que les patients constatent la réapparition des symptômes moteurs avant la prochaine prise du médicament, ce sont les akinésies de fin de dose (« wearing-off »). Ces manifestations surviennent lorsque les niveaux de dopamine passent sous le seuil de déblocage, c'est-à-dire le seuil de stimulation dopaminergique à atteindre pour passer à l'état « on », et sont aggravées par les émotions, le stress et les efforts physiques (Lees 2005) (Figure 2.4).

En début de traitement, les neurones dopaminergiques restants sont suffisamment nombreux pour prendre en charge la L-DOPA exogène et assurer une stimulation physiologique des récepteurs dopaminergiques, indépendamment des variations intracérébrales de L-DOPA. Avec le temps et la raréfaction des terminaisons dopaminergiques, les niveaux du neurotransmetteur fluctuent dans la synapse, probablement due à une diminution des capacités de stockage de la dopamine, et deviennent le reflet de la concentration de L-DOPA plasmatique. C'est alors que les fluctuations motrices s'intensifient et on voit apparaître, avec la prise de L-DOPA, l'effet « on-off ». Ce trouble moteur, apparaissant de façon imprévisible, est caractérisé par le passage brusque d'un état « on », c'est-à-dire sans

symptômes moteurs, à un état « off », où ces derniers réapparaissent. L'effet « on-off » atteindrait près de 15 % des patients parkinsoniens (Marsden 1982) et témoignerait d'une sensibilité accrue des récepteurs dopaminergiques aux fluctuations des niveaux de dopamine cérébrale.

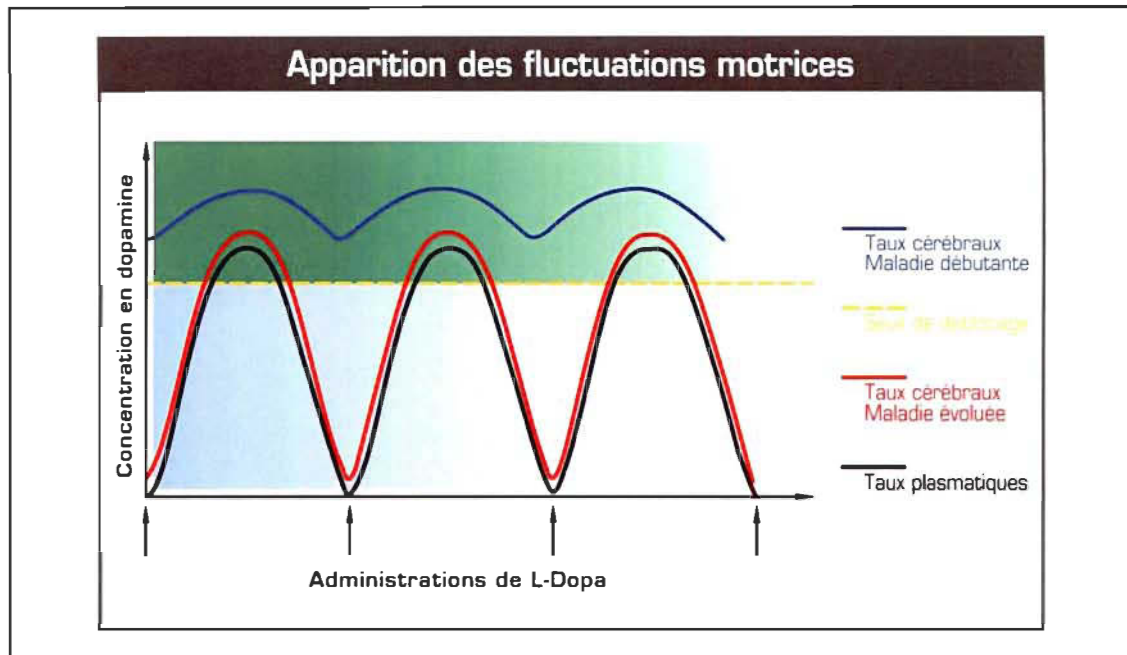


Figure 2.4 : Schéma de l'apparition des complications motrices associées à la dopathérapie (Tiré de <http://www.pharacomedicale.org/fiche1019.html>).

Plusieurs formes d'akinésie peuvent également affecter les patients parkinsoniens traités à la L-DOPA. Les akinésies du petit matin sont souvent les premières à apparaître, pouvant précéder de plusieurs mois l'apparition des autres fluctuations motrices. Elles se caractérisent par la constatation d'une akinésie au réveil, avec ou sans tremblement, traduisant l'incapacité des neurones dopaminergiques survivants de prévenir le sevrage médicamenteux de la nuit (Poewe et Wenning 2000). Les akinésies nocturnes, quant à elles, ne s'observent que chez les patients plus âgés ou en stade avancé de la maladie. L'akinésie nycthémérale survient à horaire régulier, le plus souvent en début ou en fin d'après-midi puisqu'elle pourrait résulter, entre autres, d'une compétition entre la L-DOPA et les acides aminés alimentaires au niveau de la barrière

digestive et hémato-encéphalique (Defebvre 2007). Finalement, les akinésies paradoxales, survenant après une prise de médicament, peuvent être confondues avec l'akinésie de fin de dose. Elles apparaissent 10 à 20 minutes après la prise de L-DOPA, persistent de 10 à 20 minutes et seraient assimilables à un retard d'efficacité (« delay-on »).

2.3.2 Les dyskinésies induites par la L-DOPA

Les dyskinésies induites par la L-DOPA sont caractérisées par l'apparition de mouvements moteurs incontrôlés, apparaissant plus tard que les fluctuations motrices dans l'évolution de la maladie de Parkinson. Elles sont subdivisées en trois catégories, les dyskinésies de milieu de dose, les dyskinésies de début et de fin de dose ainsi que les dystonies des périodes « off ».

Les dyskinésies de milieu de dose ou « peak-dose dyskinesias » apparaissent au moment où l'effet de la L-DOPA est maximal sur les symptômes moteurs, c'est-à-dire lorsque les niveaux de dopamine dérivée de la L-DOPA exogène sont à leur maximum (Encarnacion et Hauser 2008) et que le patient est en phase « on » (Koller *et coll.* 1999). Elles se caractérisent par des mouvements choréiformes ou choréo-athétosiques des membres, prédominants aux extrémités ou au niveau du tronc, ou encore par des manifestations dystoniques de l'extrémité céphalique (grimaces du visage, blépharospasme, torticolis) (Poewe et Wenning 2000). Ce sont les dyskinésies les plus fréquemment rencontrées chez les patients sous dopathérapie et, bien que modérées en début d'apparition, les dyskinésies de milieu de doses peuvent devenir très invalidantes avec le temps.

Les dyskinésies de début et de fin de dose, ou dyskinésies biphasiques, annoncent l'efficacité thérapeutique du médicament ou encore le retour à un état parkinsonien. En début de dose, les mouvements, le plus souvent dystoniques, affectent surtout les parties distales des membres inférieurs et sont caractérisés d'alternatifs répétitifs. Leur durée est brève puisqu'ils prédisent le

début de l'effet bénéfique du médicament. À l'inverse, ils annoncent l'épuisement de l'efficacité de la L-DOPA en fin de dose et sont caractérisés par des postures dystoniques douloureuses, prolongées et invalidantes (Defebvre 2007).

Les dystonies de périodes « off » peuvent apparaître au petit matin, caractérisées par une posture dystonique en *varus equin*, une extension du gros orteil, une flexion des autres orteils ou une tension douloureuse au mollet. Ces dystonies disparaissent après la première dose de L-DOPA.

2.3.2.1 Physiopathologie des dyskinésies induites par la L-DOPA

Les bases moléculaires des dyskinésies induites par la L-DOPA ne sont pas totalement élucidées. Toutefois, il est bien démontré que l'étendue de la perte de neurones dopaminergiques et l'administration chronique et répétée de médicaments à courte demi-vie, telle la L-DOPA, sont d'une importance capitale dans l'apparition des dyskinésies (Olanow et Koller 1998; Nutt *et coll.* 2000).

Dans des conditions physiologiques, les neurones dopaminergiques déchargent de façon tonique, résultant en une relâche relativement continue de dopamine dans la synapse. Une concentration plutôt constante du neurotransmetteur serait ainsi maintenue et l'activation des récepteurs dopaminergiques serait continue. Dans la maladie de Parkinson, la perte de plus en plus importante des neurones dopaminergiques nécessite l'administration de L-DOPA. Des dysfonctions dans le stockage et la relâche de la dopamine, provenant de la L-DOPA exogène, font en sorte que les récepteurs sont stimulés de façon intermittente, en fonction de la concentration plasmatique de L-DOPA. Dans ces conditions, la L-DOPA est incapable de normaliser l'activité des ganglions de la base et serait à l'origine des phénomènes de « priming » des relais moteurs, menant à l'induction des complications motrices (Olanow et Koller 1998). Les changements adaptatifs pathologiques qui surviennent alors au niveau des neurones dopaminergiques peuvent se produire au niveau pré-synaptique,

affectant le métabolisme de la dopamine ainsi qu'au niveau post-synaptique, affectant les récepteurs et les voies de signalisations intracellulaires (Cenci et Lundblad 2006). Toutefois, plusieurs études rapportent que les mécanismes de compensation présynaptiques ne joueraient pas un rôle crucial dans l'émergence des dyskinésies (Lee et coll. 2000; Cenci et coll. 2002; Winkler et coll. 2002).

Dans un premier temps, les changements pré-synaptiques sont reliés au processus de dénervation accompagnant la maladie de Parkinson. Impliquant une perte de mécanismes compensatoires du système nigro-strié et une modification du métabolisme, du stockage et de la relâche de dopamine, les dysfonctions pré-synaptiques font en sorte que la L-DOPA exogène, plutôt que d'être prise en charge par les neurones dopaminergiques, serait décarboxylée en dopamine dans des cellules qui ne sont pas équipées de la machinerie nécessaire au contrôle des niveaux de dopamine dans la synapse; c'est le cas par exemple des neurones sérotoninergiques et des cellules gliales (Brown *et coll.* 1999; Lopez *et coll.* 2001). Dans ces conditions, les niveaux de dopamine dans la synapse subiraient une fluctuation proportionnelle à la concentration plasmatique de L-DOPA. Il en résulterait donc une stimulation intermittente des récepteurs dopaminergiques, avec une succession de fortes et de faibles doses de dopamine (Nutt et Holford 1996), qui diffère grandement des conditions physiologiques dans le striatum et qui serait au cœur de l'émergence des dyskinésies.

Au niveau post-synaptique, la perte de terminaisons dopaminergiques dans le striatum et la stimulation non physiologique des récepteurs dopaminergiques provoquent des changements dans la plasticité synaptique, modifiant le fonctionnement normal des neurones du striatum et altérant la réponse des voies de sorties des ganglions de la base dans le contrôle du mouvement moteur. Il a été démontré que les dyskinésies, en plus d'être accompagnées d'une augmentation d'ARNm des récepteurs dopaminergiques D1, corrôlaient avec des dysfonctions dans les voies de signalisation intracellulaires provoquant

des changements post-synaptiques dans l'expression de certains gènes et protéines (Gerfen *et coll.* 1995; Bezard *et coll.* 2001; Gerfen *et coll.* 2002; Konradi *et coll.* 2004).

Les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 jouent un rôle prépondérant dans l'efficacité antiparkinsonienne de la L-DOPA et des autres agents dopaminomimétiques. La dopathérapie, en se référant au modèle classique de la signalisation des ganglions de la base, normaliserait l'activité du globus pallidus interne, perturbée par la baisse des niveaux de dopamine suite à la perte des neurones de la substance noire compacte. La L-DOPA, tout comme les agents dopaminomimétiques, provoque une augmentation importante de l'influence GABAergique inhibitrice sur le GPi en agissant sur la voie directe, et une diminution de l'influence GABAergique inhibitrice sur le GPe en agissant sur la voie indirecte. Il en résulte donc une augmentation de l'inhibition exercée sur le GPi et la SNr qui, à leur tour, ont une influence GABAergique inhibitrice grandement diminuée sur le thalamus. Par conséquent, les projections glutamatergiques excitatrices du thalamus vers le cortex sont anormalement stimulées favorisant ainsi l'apparition de mouvements moteurs vigoureux et incontrôlés (Figure 2.5) (Wichmann et DeLong 1996; Papa *et coll.* 1999; Wichmann et DeLong 2003). Selon ce modèle, une diminution excessive des influences inhibitrices du GPi et de la SNr sur le thalamus pourrait expliquer l'hyperactivité des projections thalamo-corticales menant aux dyskinésies. Toutefois, ce dernier démontre certaines inconsistances puisqu'il a paradoxalement été démontré qu'une lésion du GPi prévenait les dyskinésies (Baron *et coll.* 1996; Baron *et coll.* 2000; Lozano *et coll.* 2000), alors qu'une lésion de GPe les accentuait. Un modèle alternatif a donc été proposé suggérant, en plus du patron de relâche anormal reçu par le circuit GPe-STN-GPi, une hyperactivité du GPe, de la SNr ainsi qu'une augmentation de l'activité enképhalinergique dans le striatum due à l'augmentation de l'activité des projections cortico-striatales (Obeso *et coll.* 2000b).

2.3.2.2 Implication de la voie striato-nigrale dans l'induction des dyskinésies induites par la L-DOPA

Il a été suggéré que l'une des principales dysfonctions responsable de l'apparition des dyskinésies serait l'hyperactivité de la voie striato-nigrale directe projetant vers le GPi et la SNr (Bezard *et coll.* 2001). Cette hypothèse est très bien caractérisée et a été supportée par des études chez le primate ainsi que sur des tissus humains (Calon *et coll.* 2000; Calon *et coll.* 2003).

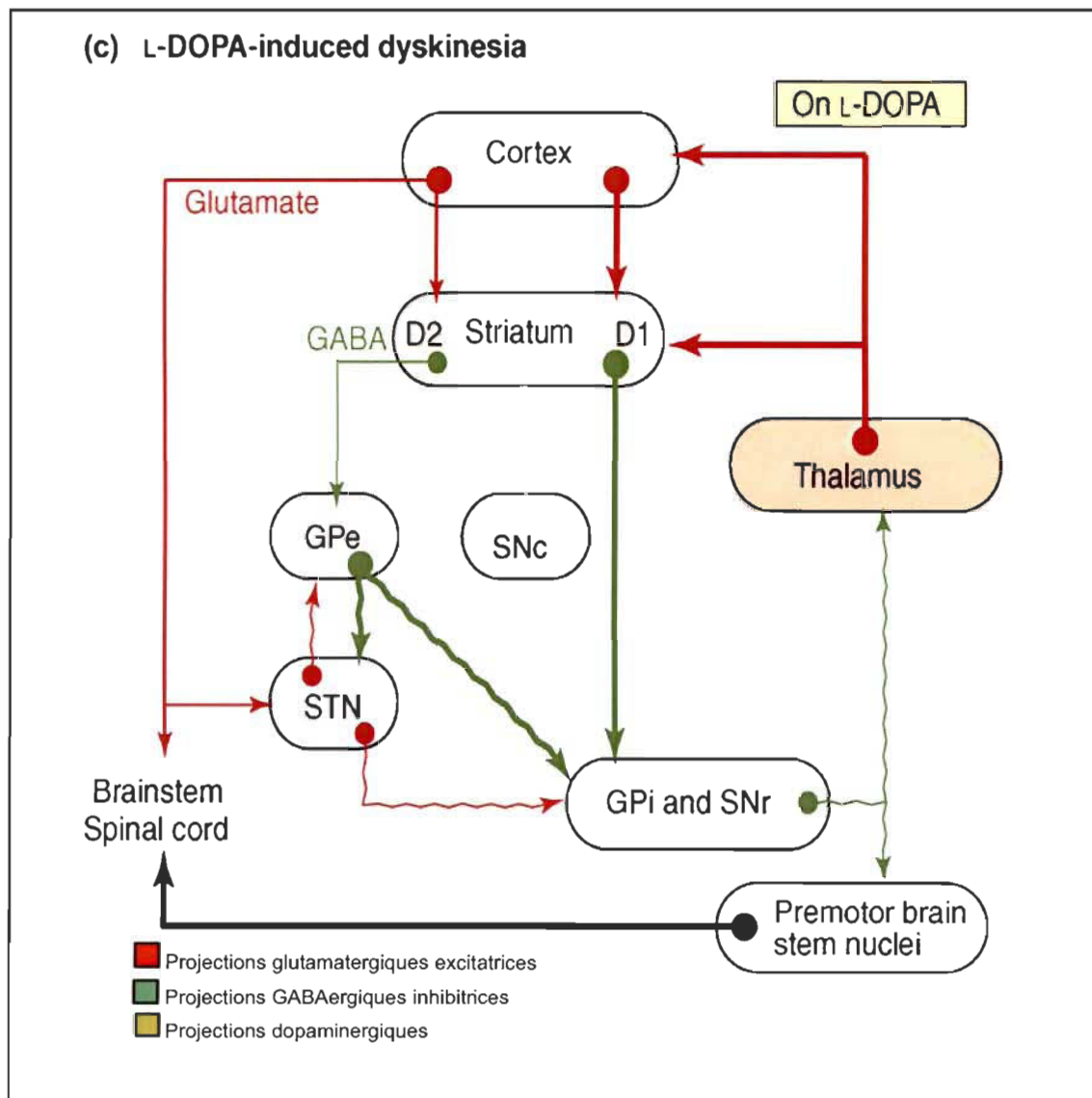


Figure 2.5 : Schéma des effets de la dopathérapie sur les circuits thalamo-corticaux des ganglions de la base (Tiré de Cenci A. Trends in Neuroscience 30 (2007) 236-243).

Toutefois, l'implication des systèmes glutamatergiques, sérotoninergiques, adrénergiques (A2A) ainsi que le rôle des neuropeptides sont de plus en plus étudiés en relation avec l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. Cependant, je m'en tiendrai au rôle joué par le système de neurotransmission dopaminergique puisqu'il est au cœur de mon travail de recherche.

Dans la maladie de Parkinson, la déplétion en dopamine se traduit par une hypersensibilité des neurones dopaminergiques, répondant de façon excessive à la présence du neurotransmetteur. La capacité de la dopamine à stimuler l'adénylate cyclase via l'activation des récepteurs D1 serait augmentée chez les patients parkinsoniens (Tong *et coll.* 2004) ainsi que dans des modèles animaux à la suite de la déplétion en dopamine (Mishra *et coll.* 1974; Pifl *et coll.* 1992a; Pifl *et coll.* 1992b; Corvol *et coll.* 2004). Cette hypersensibilité représenterait un mécanisme de compensation pour pallier au manque de dopamine et pourrait s'expliquer par une augmentation des niveaux d'expression de la protéine $G\alpha_{\text{off}}$ associée à la transmission des récepteurs dopaminergiques D1. En effet, il a été mis en évidence, chez un modèle de rat parkinsonien ainsi que dans des échantillons post-mortem de cerveaux de patients parkinsoniens, que la déplétion en dopamine au niveau du striatum provoquait une augmentation des niveaux d'expression de la protéine $G\alpha_{\text{off}}$ (Herve *et coll.* 1993; Zhuang *et coll.* 2000; Corvol *et coll.* 2004). De plus, des études chez le singe MPTP ont également démontré une corrélation entre les dyskinésies induites par la L-DOPA et une augmentation du couplage entre les récepteurs dopaminergiques D1 et la protéine $G\alpha_{\text{off}}$ (Aubert *et coll.* 2005). Ces indications suggèrent donc que les dyskinésies induites par la L-DOPA pourraient, du moins en partie, être produites par une hyperactivation de la signalisation couplée à l'AMPc dans les neurones de la voie directe.

Un accroissement de la transmission des récepteurs dopaminergiques D1 résulte en une augmentation de l'activation de la PKA qui, à son tour, est en mesure de phosphoryler plusieurs substrats tel DARPP-32 (Figure 2.6). Chez le

modèle de rat parkinsonien ayant développé des dyskinésies, les niveaux de DARPP-32 phosphorylé sur la thréonine 34, un site de phosphorylation bien connu pour être modulé par la PKA (Nishi *et coll.* 1997; Svenningsson *et coll.* 2000a), seraient anormalement élevés (Picconi *et coll.* 2003; Santini *et coll.* 2007). Lorsque DARPP-32 est phosphorylé sur la thréonine 34, la protéine est alors en mesure d'amplifier la signalisation des récepteurs D1 via l'inhibition de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Hemmings *et coll.* 1984) qui, à son tour, prévient la déphosphorylation de plusieurs protéines cibles de la cascade de signalisation intracellulaire dépendante de PKA, intensifiant ainsi la réponse modulée par l'AMPc (Greengard 2001). Dans ces conditions, DARPP-32 pourrait jouer un rôle favorisant l'apparition des dyskinésies, en exacerbant la réponse des récepteurs dopaminergiques D1 à la L-DOPA (Santini *et coll.* 2008). En ce sens, des études chez le rat dont le gène codant pour DARPP-32 a été inactivé ont démontré une diminution significative des mouvements moteurs involontaires provoqués par la L-DOPA (Santini *et coll.* 2007). Lorsque la voie de signalisation AMPc/PKA/DARPP-32 est augmentée, il en résulte donc une augmentation des niveaux de phosphorylation de protéines effectrices qui pourraient potentiellement être impliquées dans l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. Dans cette optique, il a été démontré que les dyskinésies étaient accompagnées d'une augmentation des niveaux de phosphorylation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA sur la sérine 845, un site modulé par PKA (Santini *et coll.* 2007). Ceci aurait pour effet de favoriser la transmission glutamatergique en augmentant la probabilité d'ouverture des récepteurs AMPA ainsi que leur niveau d'expression à la membrane plasmique (Banke *et coll.* 2000; Mangiavacchi et Wolf 2004). DARPP-32 pourrait donc jouer un rôle dans l'apparition des dyskinésies en facilitant l'activation des récepteurs AMPA (Figure 2.6). La PKA peut également augmenter l'activité des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) en phosphorylant la sous-unité NR1 (Neve et Seamans 2004).

L'augmentation des niveaux de phosphorylation de DARPP-32 suite à l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 par la L-DOPA pourrait

également avoir des conséquences sur les changements de l'expression des gènes associés avec l'apparition des dyskinésies. Par exemple, il a été mis en évidence que la phosphorylation de DARPP-32 sur la thréonine 34 était associée à l'augmentation de l'expression de gènes de la famille fos, comme c-fos, zif268 et arc, induite par l'activation des récepteurs D1 (Svenningsson *et coll.* 2000b; Zachariou *et coll.* 2006). Dans le striatum de modèles animaux de la maladie de Parkinson, l'utilisation d'agonistes D1 résulte en une augmentation importante des niveaux d'expression de gènes de la famille c-Fos (Berke *et coll.* 1998) et il a été démontré que l'expression de FosB ainsi que Δ FosB, un de ses isoformes produits par épissage alternatif, étaient augmentés dans le striatum des animaux dyskinétiques (Andersson *et coll.* 1999; Winkler *et coll.* 2002; Pavon *et coll.* 2006; Westin *et coll.* 2007).

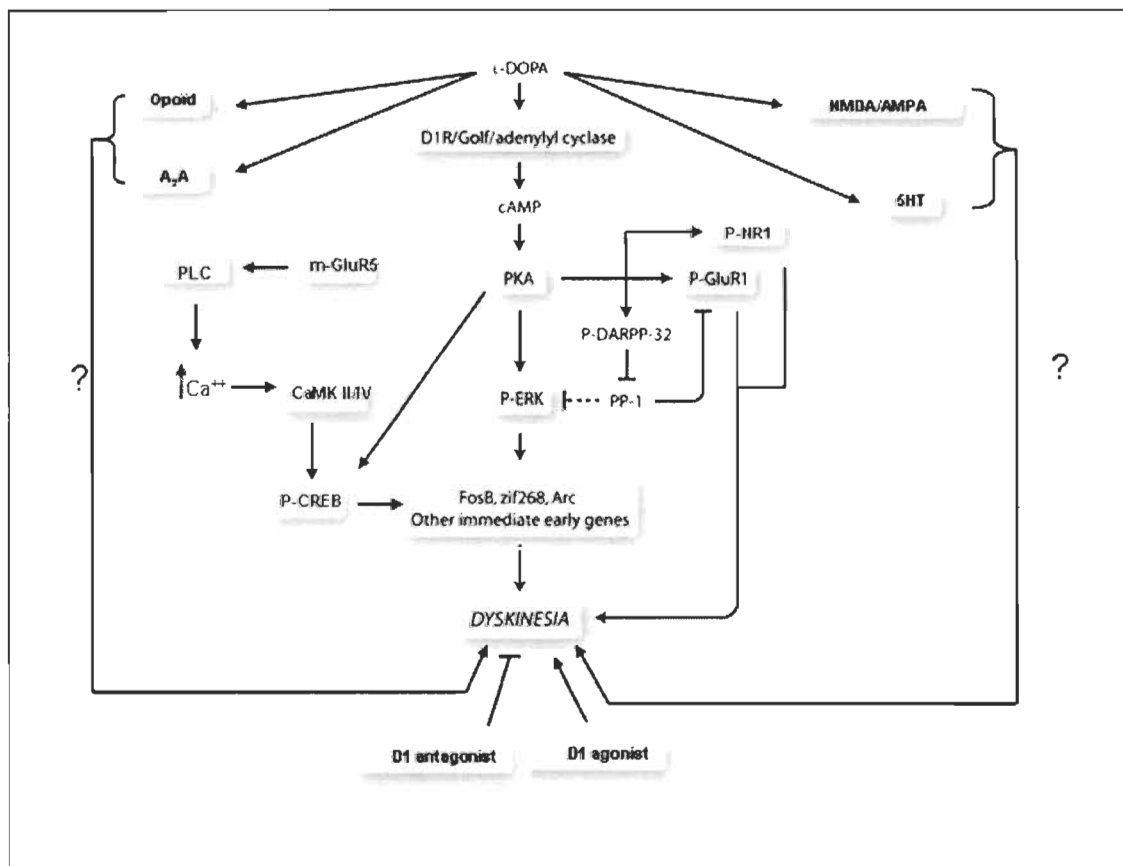


Figure 2.6 : Schéma des voies de signalisation proposées pour expliquer les dyskinésies induites par la L-DOPA (Tiré de Santini, E et coll, FEBS journal 275 (2008) 1392-1399)

Ces changements se produiraient dans les neurones coexprimant la dynorphine et donc appartenant aux projections de la voie directe (Andersson *et coll.* 1999). Récemment, une forte corrélation a été proposée entre la sévérité des dyskinésies induites par la L-DOPA et les niveaux d'expression striataux de FosB/ Δ FosB (Cenci 2002). Un des mécanismes par lequel PKA et DARPP-32 pourraient participer aux changements dans les niveaux d'expression de certains gènes associés aux dyskinésies serait par l'entremise de la modulation des niveaux d'expression et d'activation de ERK 1 et ERK 2 (ERK 1/2), une MAPkinase qui, lorsqu'activée, mène à l'activation des facteurs de transcription CREB et Elk-1 (Marais *et coll.* 1993; Xing *et coll.* 1996).

Il a été démontré que ERK 1/2 est activée suite à la dégénérescence de la voie dopaminergique nigrostriée et en réponse à l'utilisation d'agonistes dopaminergiques D1 (Gerfen *et coll.* 2002) et de L-DOPA. Ce processus se produirait via l'activation des récepteurs D1 puisque l'activation de ERK 1/2 et l'augmentation des niveaux d'expression de FosB/ Δ FosB seraient totalement prévenues lorsque la L-DOPA est administrée en combinaison avec un antagoniste sélectif des récepteurs D1 (St-Hilaire *et coll.* 2005). L'administration combinée de L-DOPA et d'un antagoniste sélectif des récepteurs D1 préviendrait également l'apparition des dyskinésies induites par la L-DOPA, démontrant encore une fois, l'importance des dysfonctions des projections de la voie directe dans l'apparition de mouvements moteurs involontaires.

Plusieurs évidences suggèrent donc l'importance de la voie striato-nigrale dans l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA et il semble que ce phénomène soit corrélé avec l'incapacité des neurones du striatum de répondre normalement à la présence de L-DOPA (Santini *et coll.* 2008).

CHAPITRE 3

LES MODÈLES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON

3.1 Les modèles basés sur l'administration de toxines systémiques.

La plupart des connaissances que nous avons aujourd'hui de la maladie de Parkinson sont dues aux innombrables études qui ont été menées sur des modèles animaux depuis les 40 dernières années. Plusieurs modèles sont très bien caractérisés dont, entre autres, les modèles « toxicologiques » utilisés pour reproduire les changements pathologiques et comportementaux de la maladie humaine. Ces modèles sont obtenus par injection systémique ou locale, de neurotoxines capables d'induire la dégénérescence sélective des neurones de la voie nigrostriée. Suite au traitement à la L-DOPA, ces modèles animaux développent tous des complications motrices à plus ou moins long terme, dépendamment de l'étendue de la lésion des neurones dopaminergiques et des doses de L-DOPA administrées.

Le primate rendu parkinsonien suite à l'administration de MPTP, causant un syndrome hautement comparable à la forme humaine de la maladie de Parkinson (Wichmann et DeLong 2003), est un modèle très bien caractérisé, mais peu utilisé étant donné les frais liés à ce genre d'études et également à la nécessité de disposer d'installations adéquates. Le MPTP peut également être administré à des souris (Heikkila *et coll.* 1989; Gerlach *et coll.* 1991) et, lorsque donné de façon chronique, peut induire la formation de corps de Lewy dans les neurones de la substance noire compacte (Fornai *et coll.* 2005; Yazdani *et coll.* 2006). Toutefois, lorsque les travaux de recherche nécessitent l'évaluation des complications motrices, il devient très ardu de travailler avec un modèle murin étant donné leur très petite taille.

Récemment, d'autres toxines ont été proposées pour répliquer les manifestations parkinsoniennes suite à l'injection systémique. Il s'agit, entre

autres, du roténone (Betarbet *et coll.* 2000; Betarbet *et coll.* 2006), un pesticide inhibant le complexe 1 de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, qui lorsqu'administré à des rats, provoque la dégénérescence nigrostriatale associée avec des inclusions s'apparentant aux corps de Lewy, formés d'alpha-synucléine et d'ubiquitine. La pertinence de ce modèle est toutefois largement remise en question (Lapointe *et coll.* 2004; Cicchetti *et coll.* 2009). Il a également été rapporté que l'époxomycine, un inhibiteur de l'activité protéolytique du protéasome, induit un état parkinsonien complet dans une étude portant sur le rat (McNaught *et coll.* 2004). Toutefois, ce dernier modèle est de plus en plus controversé puisque les résultats obtenus n'ont jamais pu être reproduits (Bove *et coll.* 2006; Kordower *et coll.* 2006; Manning-Bog *et coll.* 2006).

Les toxines peuvent également être injectées directement dans la voie nigrostriée: c'est le cas du MPP+, hautement toxique pour les neurones dopaminergiques lorsque administré de cette façon. Toutefois, le modèle d'injection de toxine le plus fréquemment utilisé est celui de l'administration de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rat et je m'attarderai davantage à ce dernier, car c'est celui que j'ai utilisé pour mes travaux de recherche *in vivo*.

Il est à noter que des modèles cellulaires de la maladie de Parkinson sont également très utiles afin d'étudier entre autres les mécanismes de neuroprotection. Par exemple, les cellules PC 12, issues d'un phéochromocytome de rat, adoptant un phénotype neuronal suite à un traitement avec le facteur de croissance du nerf (NGF), ont été utilisées afin de démontrer l'effet neuroprotecteur du resvératrol et de la quercétine (Bournival *et coll.* 2009).

3.2 Le rat rendu hémiparkinsonien suite à l'injection de la 6-hydroxydopamine

La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la dopamine et son effet biologique a été démontré il y a 40 ans lorsque l'équipe de Porter a démontré que cet agent était capable d'induire une déplétion noradrénergique efficace et persistante dans les nerfs sympathiques du cœur (Porter *et coll.* 1963). Quelques années plus tard, il a été démontré que l'injection de 6-OHDA dans la substance noire compacte était capable de provoquer la dégénérescence des neurones du système dopaminergique par un mécanisme de transport antérograde, générant ainsi le premier modèle animal de la maladie de Parkinson (Ungerstedt 1968).

La toxine, qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, doit donc être injectée directement dans le cerveau, soit dans la substance noire compacte, dans le striatum ou le faisceau médian du télencéphale (MFB), reliant le télencéphale à la substance noire, produisant ainsi une destruction neuronale plus ou moins massive. Cette versatilité permet, selon les besoins, d'obtenir un modèle présentant une lésion partielle et progressive, lorsque la toxine est administrée dans le striatum ou encore une lésion sévère et immédiate lorsque la substance est injectée dans le MFB ou la substance noire compacte.

La mort cellulaire débute environ 12 heures après l'injection de la toxine et est pratiquement totalement établie en deux ou trois jours (Faull et Laverty 1969; Lee *et coll.* 1996; Deumens *et coll.* 2002). L'injection se fait principalement de façon unilatérale afin d'éviter des effets très néfastes associés à la dénervation excessive pouvant mener à la mort de l'animal et également de permettre l'utilisation de l'hémisphère intacte comme contrôle. Bien entendu, ce modèle, tout comme celui du MPTP, est associé à une réponse inflammatoire marquée observée entre autres par l'activation de la microglie via la présence de cellules OX42-positives (Rodrigues *et coll.* 2001) ou l'augmentation de la liaison du 1-(2-chlorophenyl)-N-méthyl-N-(1-méthylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide ((11)-C-PK-11195) (Cicchetti *et coll.* 2002) révèlent l'importante activation de la microglie dans le cerveau des rats. Ces manifestations rappellent celles

observées chez l'humain puisque l'inflammation fait partie intégrante des mécanismes biologiques sous-jacents à la maladie de Parkinson (Hirsch *et coll.* 2005). Ce modèle est encore largement utilisé, malgré l'évolution dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson dû à son faible coût, à la simplicité des procédures d'injection et à la reproductibilité des lésions obtenues.

Les dommages neuronaux induits par la 6-OHDA sont principalement attribuables au stress oxydatif important provoqué par la toxine. Ayant une structure similaire à la dopamine, la 6-OHDA a une forte affinité pour le transporteur de la dopamine qui achemine la toxine à l'intérieur des neurones dopaminergiques. Une fois dans la terminaison, la 6-OHDA s'accumule dans le cytosol et, via son auto-oxydation, provoque la formation de radicaux libres, hautement toxiques pour la cellule (Schober 2004). La 6-OHDA peut également s'accumuler dans les mitochondries où elle provoque l'inhibition du complexe 1 de la chaîne de transport des électrons (Schober 2004). La 6-OHDA est capable d'induire la dégénérescence des neurones noradrénergiques: c'est la raison pour laquelle la désipramine, un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, est administrée avant l'injection intracérébrale de 6-OHDA.

Les rats atteints d'une lésion unilatérale de la voie nigrostriée présentent un comportement rotatoire marqué suite à l'administration systémique d'un agoniste dopaminergique. Cette caractéristique est largement utilisée afin d'évaluer l'étendue des dommages induits par la 6-OHDA. Suite à l'injection d'apomorphine, agissant directement sur les récepteurs dopaminergiques présents sur l'élément post-synaptique rendus hypersensibles suite à la dénervation, les animaux présentent un comportement rotatoire contralatéral à la lésion. Toutefois lors de l'administration d'un agent agissant au niveau présynaptique comme l'amphétamine, facilitant la relâche du neurotransmetteur principalement du côté non lésé, les animaux démontrent un comportement rotatoire ipsilatéral (Meredith et Kang 2006). Il a été démontré que les rats effectuant cinq tours complets ou plus par minute, suite à l'injection

d'apomorphine, étaient atteints de dénervation sévère (plus de 90 %) de la voie nigrostriée (Papa *et coll.* 1994; Schwarting et Huston 1996). De plus, l'administration de L-DOPA chez ces derniers se traduit par l'apparition, à plus ou moins long terme, de mouvements anormaux involontaires.

Dans la présente étude, nous avons utilisé un modèle de rat recevant la 6-OHDA dans le MFB de façon à obtenir une dénervation massive et rapide de la voie nigrostriée. Ces animaux développent tous des complications motrices suite à la première administration de L-DOPA. La raison pour laquelle nous avons privilégié ce modèle est que ce dernier est le plus approprié pour des travaux de recherche s'intéressant principalement à l'étude des mouvements anormaux involontaires induits par un traitement à long terme avec la L-DOPA (Winkler *et coll.* 2002). Toutefois, il est important de noter que ce modèle présente également quelques désavantages: la lésion induite par la 6-OHDA est très rapide, contrairement à ce qui est observé dans la maladie de Parkinson. De plus, le traitement à la L-DOPA provoque l'émergence de mouvements anormaux involontaires dès la première injection, ne reflétant pas le caractère progressif de l'apparition des dyskinésies chez le patient parkinsonien. Finalement, bien que peu d'études existent à ce sujet, certains mécanismes pourraient se produire au niveau de l'hémisphère intact afin de compenser la perte de neurones dopaminergiques dans l'hémisphère lésé.

CHAPITRE 4

LES PROTÉINES RESPONSABLES DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE DES NEURONES

Le cytosol des neurones, comme toutes les autres cellules eucaryotes, est parcouru d'un réseau de fibres protéiques appelé cytosquelette. Ce réseau dynamique s'assemble et se désassemble constamment afin de maintenir la morphologie des neurones et de permettre le transport d'organites. Les microfilaments, les neurofilaments et les microtubules sont les fibres protéiques qui constituent le réseau tri-dimensionnel du cytosquelette (Bear 1999).

4.1 Les microfilaments

Les microfilaments (Figure 4.1) sont de longues fibres protéiques d'un diamètre d'environ 7 nm. Ils sont présents dans tout le neurone mais sont particulièrement abondants le long des neurites et sont solidement attachés à la membrane par un filet de protéines fibreuses. Les microfilaments sont constitués de deux chaînes protéiques entrelacées formées de molécules d'actine qui, en polymérisant, confèrent à la cellule sa structure tridimensionnelle. Ils sont constamment en processus de polymérisation et dépolymérisation contrôlés par différents signaux intraneuronaux (Bear 1999).

4.2 Les neurofilaments

Les neurofilaments (Figure 4.1), appelés filaments intermédiaires dans toutes les autres cellules du corps, ont un diamètre de 10 nm intermédiaire entre les microfilaments et les microtubules. Ils sont formés par la co-polymérisation de trois protéines de la famille des filaments intermédiaires appelées NF-L, NF-M et NF-H selon leur poids. Aucune de ces sous-unités n'est capable de s'assembler en filament en l'absence des deux autres (Lee *et coll.* 1993) et la formation de dimères NF-L avec NF-M ou NF-H est probablement nécessaire à la formation

des filaments (Jacomy *et coll.* 1999; Liu *et coll.* 2004). Ces dimères s'assemblent pour former des tétramères et huit tétramères s'agrègent pour former un neurofilament. Contrairement aux microfilaments, ces fibres protéiques sont constituées de longues molécules protéiques individuelles enroulées très serrées, rendant les neurofilaments beaucoup plus stables et par le fait même moins dynamiques que les microfilaments. Des dysfonctions dans les filaments intermédiaires affecteraient la stabilisation des axones (Larivière et Julien 2004) et ce phénomène pourrait être à la base de certaines pathologies par exemple la maladie d'Alzheimer (Raven *et coll.* 2007). En effet, il a été démontré que les enchevêtrements neurofibrillaires dans la maladie d'Alzheimer étaient formés entre autres de neurofilaments anormalement phosphorylés (Liu *et coll.* 2004).

4.3 Les microtubules

Les microtubules (Figure 4.1) sont les fibres protéiques du cytosquelette ayant la plus grande taille avec un diamètre d'environ 20 nm.

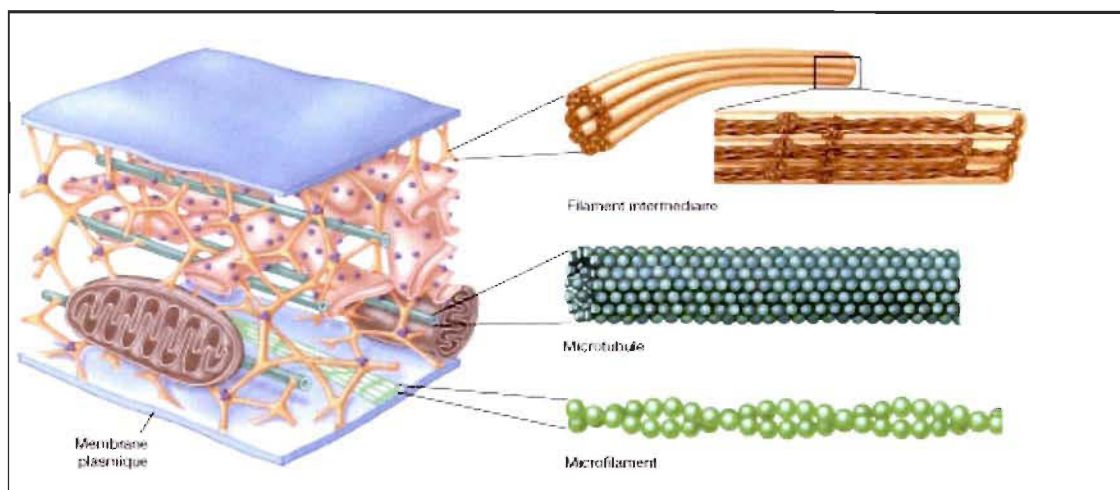


Figure 4.1 : Schéma des molécules constitutives du cytosquelette (Tiré de Raven et coll, "Biologie", de boeck Université, France (2007) pp 98-100.)

Ils se situent principalement le long des neurites et sont constitués de 13 protofilaments protéiques, chacun formé par la polymérisation de dimères d' α

et de β tubuline. Les protofilaments sont disposés côte à côte de façon à former un tube creux, procurant au microtubule sa forme tubulaire caractéristique. Outre leur implication dans la facilitation du mouvement cellulaire, les microtubules participent au mouvement des matériaux dans la cellule.

Un groupe de protéines appelées protéines associées aux microtubules (MAP), sont responsables de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules. Les MAP sont divisées en deux sous-groupes : les MAP motrices, formées de la dynéine et de la kinésine ainsi que les MAP structurales constituées principalement de MAP 2, MAP 4, stathmine et tau. J'élaborerai davantage sur cette dernière protéine, car elle est au centre de mes travaux de recherche.

4.4 La protéine tau

Tau fût isolée pour la première fois en 1975 et décrite comme une protéine associée à la tubuline et ayant la capacité de promouvoir la polymérisation et la stabilisation des microtubules *in vitro* (Weingarten *et coll.* 1975; Clevelet *et coll.* 1977). Le gène codant pour la protéine tau (MAPT) est localisé sur le chromosome 17q21 et contient 15 exons, dont 11 qui sont impliqués dans la formation des principaux isoformes (Buee *et coll.* 2000). Six isoformes majeurs de tau sont synthétisés par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 dans le cerveau adulte humain et diffèrent par la présence ou l'absence d'un ou deux inserts dans la partie N-terminale (0N, 1N, 2N) ainsi que trois ou quatre répétitions de domaines de liaisons à la tubuline dans la partie C-terminale (3R ou 4R). Sous sa forme phosphorylée hautement soluble, la protéine tau favorise la stabilisation et l'assemblage des microtubules nécessaires à la croissance et au transport axonal. Elle se situe principalement dans les axones des neurones, mais est également présente au niveau des compartiments somato-dendritiques des neurones, des cellules gliales et des astrocytes (Papasozomenos et Binder 1987; Migheli *et coll.* 1988). La phosphorylation de certains résidus sur la protéine tau, situés dans les domaines de liaison à la tubuline, compromet sa liaison avec les microtubules et en provoque son détachement (Hirokawa *et coll.*

1988; Buee *et coll.* 2000). La phosphorylation de tau sur des sites n'étant pas compris dans les domaines de liaison aux microtubules serait impliquée dans la régulation de la stabilité du cytosquelette (Cho et Johnson 2003).

Cependant, lorsque le transport axonal ne fonctionne pas normalement, il peut en découler des dysfonctions dans la neurotransmission des signaux qui peuvent provoquer des modifications dans l'organisation des synapses (Gendron et Petrucelli 2009).

C'est au milieu des années 80 que tau fût définie comme étant une phosphoprotéine (Grundke-Iqbal *et coll.* 1986; Ihara *et coll.* 1986; Baudier *et coll.* 1987). 84 sites de phosphorylation potentiels possédant des résidus sérines ou thréonines ont été identifiés sur le plus long isoforme de la protéine tau au niveau du système nerveux central (Hanger *et coll.* 2007). Plusieurs kinases ont été reconnues pour être impliquées dans la phosphorylation de tau (Anderton *et coll.* 2001; Cruz et Tsai 2004; Mandelkow *et coll.* 2004; Feijoo *et coll.* 2005; Hanger *et coll.* 2007) et elles sont subdivisées en deux groupes : les protéines kinases dirigées ou non contre les prolines, respectivement PDPK ou Non-PDPK. Cdk5, GSK3, la caséine kinase 1, p38 MAPkinase ainsi que JNK font parties du premier groupe tandis que la PKA, la protéine kinase c (PKC) et la calmoduline kinase II (CAMKII) font partie du second. PKA, Cdk5 et GSK3 sont parmi les candidates les plus susceptibles de phosphoryler tau (Baumann *et coll.* 1993; Paudel *et coll.* 1993; Robertson *et coll.* 1993; Mandelkow *et coll.* 1992; Jicha *et coll.* 1999; Liu *et coll.* 2004; Sun *et coll.* 2005; Zhang *et coll.* 2006) et ces protéines sont également des acteurs moléculaires principaux dans la signalisation des récepteurs dopaminergiques.

La phosphorylation de tau joue un rôle physiologique dans la modulation de l'affinité de la protéine pour les microtubules et les membranes (Brandt *et coll.* 1995). Les processus de phosphorylation et d'épissage alternatifs jouent également un rôle clé au cours du développement. Dans les stades précoces, un seul isoforme de tau est présent et la protéine est hautement phosphorylée

(Kosik *et coll.* 1989; Goedert *et coll.* 1989). Dans le cerveau mature, on retrouve les six isoformes de tau et leurs niveaux de phosphorylation sont grandement diminués, reflétant l'importance de la plasticité neuronale dans l'embryogenèse. La phosphorylation de tau est donc un processus essentiel dans la régulation de sa fonction et dans le développement.

4.4.1 Rôles de tau dans l'initiation et le développement de la neurodégénérescence

Il a été démontré que des modifications dans la protéine tau pourraient diminuer sa capacité de promouvoir l'assemblage des microtubules (Hasegawa *et coll.* 1998; Hong *et coll.* 1998; Dayanandan *et coll.* 1999) ou augmenter son agrégation sous forme d'enchevêtrements (Goedert *et coll.* 1999; Nacharaju *et coll.* 1999), conférant ainsi un caractère toxique à la protéine. L'implication de tau dans la neurodégénérescence pourrait donc se produire via une combinaison de gain de fonctions toxiques, suite à des modifications de la protéine, et à une perte de fonctions normales provoquant des effets nocifs (Gendron et Petrucelli 2009). Plusieurs modifications post-transcriptionnelles peuvent se produire sur la protéine tau, mais l'hyperphosphorylation est de loin la mieux caractérisée et la plus susceptible de conférer un caractère toxique à la protéine.

Une hyperphosphorylation de la protéine pourrait compromettre son rôle dans la stabilisation des microtubules et favoriser son agrégation. En effet, lorsque tau devient anormalement phosphorylée, elle se détache des microtubules, ce qui provoque une dépolymérisation de ces derniers et la formation d'enchevêtrements de tau, hautement toxiques pour la cellule (Figure 4.2). Il a également été démontré que même en l'absence d'enchevêtrements, la phosphorylation de tau provoque une désorganisation des composantes du cytosquelette, un gonflement des axones et la présence anormale d'agrégats de mitochondries et lysosomes dans l'axoplasme, reflétant une perte de fonctionnalité des microtubules (Ahlijanian *et coll.* 2000; Bian *et coll.* 2002)

pouvant mener à la neurodégénérescence. Les maladies neurodégénératives caractérisées par des modifications anormales de la protéine tau sont regroupées sous le nom de tauopathies. La plus commune d'entre elles est la maladie d'Alzheimer, caractérisée par la présence de plaques séniles constituées de bêta-amyloïde et d'enchevêtrements neurofibrillaires formées d'agrégats de la protéine tau. On retrouve également dans ce groupe la paralysie supranucléaire progressive, la maladie de Pick, la démence frontotemporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (DFTP-17), la dégénérescence cortico-basale, le syndrome de Down, le parkinsonisme post-encéphalitique et d'autres tauopathies telles la démence parkinsonienne, les maladies à prions et la sclérose latérale amyotrophique.

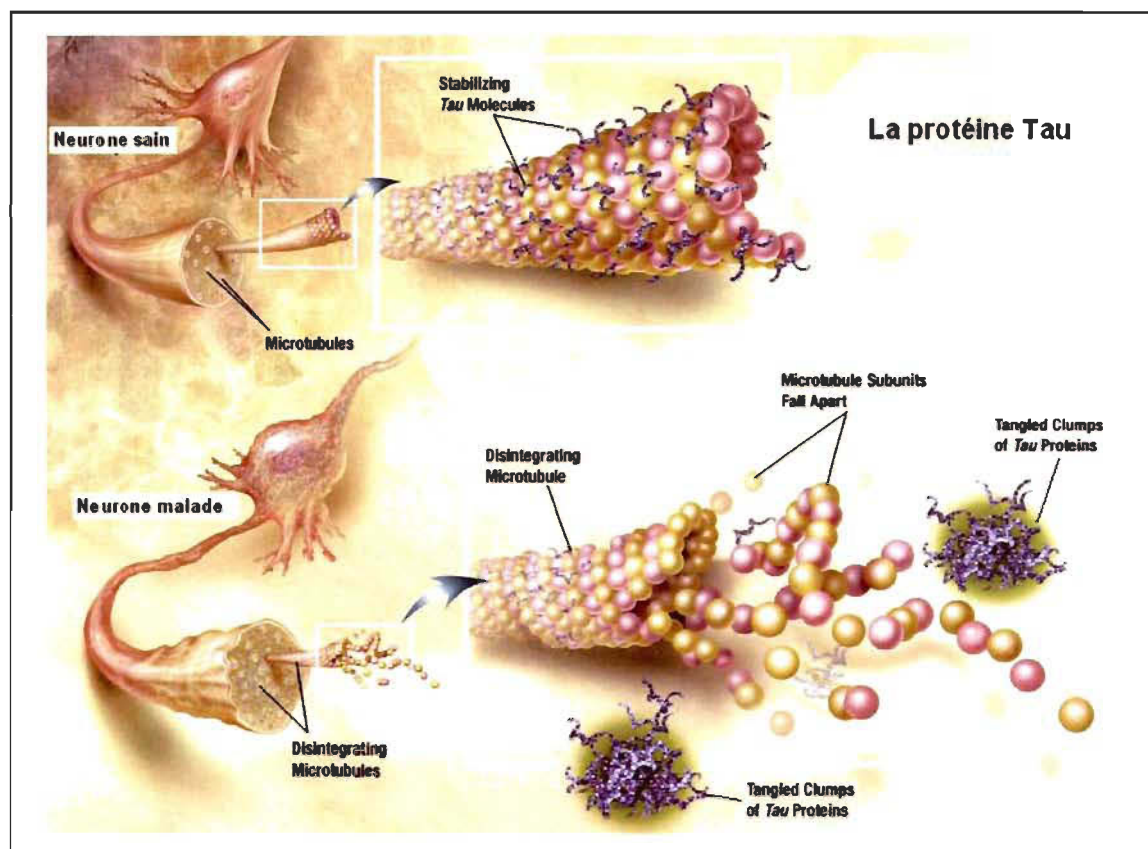


Figure 4.2 : Schéma du rôle proposé de la phosphorylation anormale de tau dans la dégénérescence neuronale (Tiré de: http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Neurological/Images/Alzheimer_Tau.jpg)

Des évidences récentes ont suggéré que l'inhibition de certaines kinases impliquées dans la phosphorylation de tau pourrait prévenir la phosphorylation anormale de la protéine et constituer une avenue intéressante dans le design de médicaments utilisés pour le traitement de tauopathies. (Mazanetz et Fischer 2007). Ce défi en est toutefois un de taille pour les raisons suivantes : 1) la phosphorylation de tau est modulée par plusieurs kinases et une seule kinase serait en mesure de phosphoryler plusieurs sites 2) la phosphorylation de tau par une kinase pourrait faire en sorte que la protéine devienne un meilleur substrat pour une autre kinase et 3) l'activation de certaines kinases pourrait faciliter la stimulation d'autres kinases impliquées dans la phosphorylation de tau (Sharma *et coll.* 1999; Zukerberg *et coll.* 2000).

L'implication de la protéine tau dans les maladies neurodégénératives semble donc être un phénomène clairement démontré, toutefois, le rôle tenu par l'hyperphosphorylation de cette protéine dans les processus neurodégénératifs reste à élucider.

CHAPITRE 5

RATIONNELLE ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

5.1 Est-ce que la stimulation des récepteurs dopaminergiques est responsable de l'hyperphosphorylation de la protéine tau?

De plus en plus d'indications suggèrent que l'augmentation des niveaux de dopamine extracellulaire serait associée à des modifications dans l'organisation des synapses. Par exemple, il a été suggéré que l'exposition répétée à des psychostimulants tels que la cocaïne et l'amphétamine, agissant sur les transporteurs des monoamines et provoquant une augmentation des niveaux de dopamine extracellulaire, induirait des changements persistants dans le cerveau qui dépasseraient largement leur action pharmacologique (Robinson et Kolb 1999). À la suite de ce postulat, plusieurs études ont rapporté que des changements se produiraient principalement dans le système de neurotransmission dopaminergique et induiraient également des changements dans l'organisation structurale des neurones, modifiant entre autres la densité des épines dendritiques dans le noyau accumbens, le cortex préfrontal (Robinson et Kolb 1997; Robinson et Kolb 1999) et le striatum (Li *et coll.* 2003). Ces résultats suggèrent donc que les changements persistants observés suite à l'utilisation chronique de psychostimulants pourraient être attribuables à leurs capacités de provoquer la réorganisation de la connectivité synaptique dans le cerveau. Des études récentes ont démontré que cette réorganisation persisterait à long terme dans les neurones exprimant les récepteurs dopaminergiques D1, mais serait transitoire dans les neurones exprimant les récepteurs D2. De plus, un patron comparable dans les niveaux d'expression du facteur de transcription Δ FosB a été démontré, suggérant son implication dans ce processus (Lee *et coll.* 2006).

L'expression de Δ FosB est modulée par la signalisation des récepteurs D1 dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum (Zachariou *et coll.* 2006) et

Cdk5, dont le gène est une cible de Δ FosB, serait aussi impliquée dans les changements adaptatifs associés à un traitement chronique à la cocaïne (Bibb *et coll.* 2001a). En effet il a été démontré que la roscovitine, un inhibiteur sélectif de Cdk5, lorsqu'injecté directement dans le noyau accumbens, est capable de prévenir de façon significative les modifications des épines dendritiques provoquées par la cocaïne (Norrholm *et coll.* 2003). Cdk5 est une kinase dont l'implication dans la modulation de protéines impliquées dans le maintien du cytosquelette des neurones a été reconnue, agissant entre autres sur la spinophilline et la protéine tau (Baumann *et coll.* 1993; Paudel *et coll.* 1993; Noble *et coll.* 2000; Robinson et Kolb 2004; Futter *et coll.* 2005; Causeret *et coll.* 2007). L'importance dans les changements du cytosquelette des neurones dans les adaptations moléculaires aux psychostimulants est donc bien établie.

En plus des effets sur la densité des synapses, des études ont récemment rapporté que l'augmentation des niveaux de dopamine extracellulaire serait associée à la dégénérescence des neurones GABAergiques post-synaptiques du striatum (Cyr *et coll.* 2003). Ces études ont été effectuées chez des souris dont le gène pour le transporteur de la dopamine a été inactivé (DATKO), modèle pour lequel une stimulation hypertonique persistante des récepteurs dopaminergiques accompagnée d'une hyperactivité locomotrice a été démontrée (Giros *et coll.* 1996; Gainetdinov *et coll.* 1998; Jones *et coll.* 1998; Gainetdinov *et coll.* 1999). Il est intéressant de noter qu'une augmentation des niveaux d'expression de Δ FosB et d'activation de Cdk5, reconnues pour résulter de l'activation chronique des récepteurs dopaminergiques (Nestler *et coll.* 1999; Bibb *et coll.* 2001b), ont également été observées dans ce modèle, laissant entrevoir la possibilité que la mort cellulaire observée chez les souris DATKO puisse être associée à l'hyperactivation de la signalisation dopaminergique. Qui plus est, l'apparition de symptômes s'apparentant aux dyskinésies a été observée chez les souris DATKO et l'inhibition chronique de la synthèse de dopamine en prévenait l'émergence. De plus, une hyperphosphorylation de la protéine tau accompagne l'augmentation des niveaux d'expression de Cdk5

chez les souris ayant développé des dyskinésies (Cyr *et coll.* 2003). Dans le même sens, une autre étude a démontré que la stimulation chronique des récepteurs dopaminergiques induisait l'hyperphosphorylation de MAP2 (Song *et coll.* 2002), une autre protéine associée au cytosquelette, laissant entrevoir la possibilité que l'activation de ces récepteurs pourrait provoquer des changements dans la morphologie des neurones.

À la lumière de ces résultats, la première hypothèse de recherche que nous avons émise est que l'hyperphosphorylation de la protéine tau serait probablement attribuable à la stimulation directe des récepteurs dopaminergiques, et particulièrement les récepteurs D1. De plus, les kinases impliquées dans la signalisation des récepteurs dopaminergiques D1 et reconnues pour induire la phosphorylation de tau, telles que PKA, Cdk5 et GSK3, joueraient un rôle central dans ce phénomène. Le premier objectif du présent travail de recherche était donc d'investiguer, dans les cellules SK-N-MC et les tranches fraîches de striatum de rats l'effet de la stimulation des récepteurs dopaminergiques sur les niveaux de phosphorylation de la protéine tau. Nous souhaitons également étudier l'implication de différentes kinases de la signalisation des récepteurs D1, connues pour phosphoryler tau, dans ce processus.

Les SK-N-MC sont des cellules adhérentes issues de neuroblastomes humains. Ces dernières n'expriment de façon endogène que les récepteurs dopaminergiques D1 (Sidhu *et coll.* 1999) sans exprimer les récepteurs D5 et les récepteurs D2-like (D2, D3 et D4), constituant ainsi un modèle post-synaptique particulier. Nous avons choisi ce modèle puisqu'il nous sera très utile afin de déterminer quels sont les processus qui sont spécifiquement attribuables à l'activation des récepteurs D1.

Au cerveau, les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 post-synaptiques sont principalement exprimés sur les neurones épineux de taille moyenne constituant la grande majorité (95 %) des cellules du striatum. Nous avons donc choisi

d'utiliser, comme second modèle d'étude, des tranches fraîches de striatum de rats. Ces dernières expriment les récepteurs D1-like et D2-like post-synaptiques (Dawson *et coll.* 1986; Weiner *et coll.* 1991) en plus de tous les autres récepteurs présents dans cette structure du cerveau. Les tranches de striatum de rats ont été traitées dans du liquide cébrospinal artificiel oxygéné pour un délai maximal de 6 à 8 heures au-delà duquel leur viabilité est compromise. Ce modèle en est un qui se rapproche beaucoup plus des conditions physiologiques et qui nous permettra de comparer les résultats obtenus avec les SK-N-MC afin de dresser un portrait plus complet et réaliste des événements survenant suite à la stimulation des récepteurs dopaminergiques.

5.2 Est-ce que l'augmentation des niveaux de dopamine, provoquée par l'administration chronique de la L-DOPA dans la maladie de Parkinson, pourrait être associée à l'hyperphosphorylation de la protéine tau laquelle pourrait être en lien avec l'émergence des dyskinésies?

L'administration de L-DOPA provoque, chez les patients parkinsoniens, une augmentation très importante des niveaux de dopamine dans la synapse puisque les neurones pré-synaptiques responsable de l'homéostasie du neurotransmetteur dégénèrent dans cette maladie. L'hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques dans ces conditions ainsi que le caractère intermittent de la stimulation provoquée par la L-DOPA sont deux facteurs très importants dans l'induction des dyskinésies. Étant donné qu'il a été démontré qu'une augmentation des niveaux de dopamine extracellulaire corrèle avec des modifications dans la densité synaptique et une hyperphosphorylation de la protéine tau, nous avons émis la seconde hypothèse de recherche : la déplétion en dopamine ainsi que la stimulation chronique des récepteurs dopaminergiques provoquée par l'administration de la L-DOPA, pourraient avoir une influence profonde sur les protéines structurales du cytosquelette et être associées à une hyperphosphorylation de la protéine tau. Ces changements dans l'organisation des neurones pourraient mener à des modifications de la plasticité synaptique et constituer un nouveau mécanisme moléculaire

susceptible d'être à la base de l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. Le second but du présent travail de recherche est donc d'investiguer chez le rat hémiparkinsonien 1) l'effet d'une stimulation intermittente à long terme des récepteurs dopaminergiques par la L-DOPA, 2) l'effet de l'inhibition de la PKA, protéine centrale de la cascade de signalisation dopaminergique et 3) l'effet de la stimulation continue des récepteurs à la dopamine sur l'induction des dyskinésies, l'expression de marqueurs connus des complications motrices et les niveaux de phosphorylation de la protéine tau dans le striatum.

Les prochains chapitres de cet ouvrage seront consacrés à la présentation de mes travaux de recherche. À travers le chapitre 5, le rôle de l'activation des récepteurs dopaminergiques dans la phosphorylation de la protéine tau sera discuté. Je présenterai sous forme d'article scientifique, les résultats de travaux de recherche étudiant le rôle joué par les kinases PKA, Cdk5 et GSK3 dans la phosphorylation de la protéine tau induite par l'activation des récepteurs D1 dans un modèle de tranches de striatum de rats. Dans cette partie de mes travaux de recherche, j'ai réalisé plus de 80 % des manipulations et analyses. Christian Patenaude, 2e auteur, m'a enseigné la technique utilisée afin de réaliser les tranches de striatum et a effectué les analyses de la relâche de lactate déshydrogénase alors que quelques analyses d'immunobuvardage de type western ont été réalisées par Julie Allyson, 3e auteur, dans le cadre de son stage en Biologie Médicale. J'ai rédigé cet article en collaboration avec Christian Patenaude, Guy Massicotte et Michel Cyr, tous co-auteurs de ce papier publié dans la revue *neuropharmacology* en septembre 2009 (Lebel, M. *et al.* (2009) "Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways", *Neuropharmacology* 57:392-402.)

Dans le chapitre 6, je présenterai sous forme d'article scientifique, un article qui explore les conséquences cellulaires de la phosphorylation de la protéine tau induite par l'activation des récepteurs dopaminergiques dans les cellules SK-N-MC. Dans cette partie de mes travaux de recherche, j'ai réalisé seule toutes les manipulations et analyses et j'ai rédigé ce papier avec l'aide de mon directeur de recherche et co-auteur Michel Cyr. Ce papier fût accepté le 5 mai 2010 pour publication dans la revue *Synapse*. (Lebel, M. and Cyr, M. (2010) "Molecular and Cellular Events of Dopamine D1 Receptor-Mediated Tau Phosphorylation in SK-N-MC cells", *Synapse*. In press)

Dans le chapitre 7, le rôle de la PKA et des protéines du cytosquelette dans la maladie de Parkinson et les dyskinésies induites par la L-DOPA sera présenté. Je dévoilerai, encore une fois sous forme d'article scientifique, les résultats de mes travaux de recherche effectués *in vivo*, sur un modèle de rat

hémiparkinsonien. Ce papier révèle les résultats d'une étude biochimique et comportementale explorant le rôle de la PKA et des protéines du cytosquelette dans l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. Dans cette dernière partie de mes travaux recherche, j'ai effectué la grande majorité (80 %) des manipulations et analyses. J'ai reçu l'assistance grandement appréciée de Geneviève Bureau et Michel Cyr, respectivement 3^e et dernier auteurs, pour la réalisation des chirurgies stéréotaxiques, les injections quotidiennes de L-DOPA et le prélèvement des cerveaux des animaux. Quelques analyses d'immunobuvardage de type western ont été effectuées par Laure Chagniel, 2^e auteur, dans le cadre de son stage en Biologie médicale. Ce papier a été rédigé en collaboration avec Michel Cyr directeur de recherche et co-auteur et publié dans la revue *Neurobiology of Disease* (Lebel, M. *et al.* (2010) "Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat", *Neurobiology of Disease* 38 (1): 59-67).

PARTIE 2

RÉSULTATS

CHAPITRE 6

RÔLE DE L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES D1 DANS LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE TAU DANS UN MODÈLE DE TRANCHES DE STRIATUM DE RATS

6.1 Dopamine D1 Receptor Activation Induces Tau Phosphorylation: Differential Involvement of PKA, Cdk5 and GSK3 Signaling Pathways

Manon Lebel, Christian Patenaude, Julie Allyson, Guy Massicotte and Michel Cyr

Groupe de recherche en Neurosciences, Département de chimie-biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boul. des Forges, C.P. 500,
Trois-Rivières (QC) G9A 5H7

6.2 Résumé

De plus en plus d'évidences suggèrent que les médicaments modifiant les niveaux de dopamine dans le cerveau induiraient des changements au niveau du cytosquelette. Ces modifications pourraient avoir un impact neuronal important sur la plasticité synaptique des neurones puisque les constituants du cytosquelette sont impliqués dans le maintien des prolongements dendritiques et que leur déstabilisation pourrait influencer l'organisation des dendrites, des épines dendritiques et des synapses dans les neurones. Nous avons mis en évidence, à travers ce travail de recherche, une cascade d'évènements moléculaires liant l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 à la phosphorylation anormale de la protéine tau normalement impliquée dans la stabilisation des microtubules. Nous démontrons que, dans les cellules SK-N-MC et dans les tranches de striatum de rats, l'utilisation d'un agoniste dopaminergique des récepteurs D1 augmente les niveaux de tau phosphorylée sur des sites modulés par la PKA, Cdk5 et GSK3. Ce processus semble modulé par l'activation de mécanismes dépendants du calcium intracellulaire faisant suite à la stimulation des récepteurs D1 et à l'activation de la PKA. Il est à noter que la stimulation des récepteurs D2 n'a aucun effet sur les niveaux de phosphorylation de tau dans nos conditions expérimentales. De plus, nous démontrons, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, que tau peut être phosphorylée directement par la PKA mais également par le biais de l'augmentation des niveaux intracellulaires de calcium, menant à l'activation de Cdk5 suite au clivage de p35 en p25 par la calpaïne et à l'activation de GSK3 β suite à sa phosphorylation sur la tyrosine 216. Plusieurs maladies neurodégénératives sont caractérisées par des dysfonctions de tau et son hyperphosphorylation provoque, à long terme, des effets toxiques. Toutefois, dans nos études à court terme, nous n'avons observé aucune corrélation entre la phosphorylation de tau et les dommages cellulaires. Ces résultats démontrent, pour la première fois, que l'activation des récepteurs D1 pourrait avoir une influence profonde sur certains constituants du cytosquelette neuronal comme la protéine tau.

6.3 Abstract

Increasing evidence is demonstrating that drugs affecting dopamine levels in the brain induce cytoskeletal modifications. These evolving changes may impact neuronal synaptic plasticity as cytoskeletal constituents are involved in the maintenance of dendritic processes, and any alterations in their stability could influence major cellular compartments of neurons, such as dendrites, spines and synapses. Here, we describe a molecular chain of events that links dopamine D1 receptor activation to hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau, which is normally involved in microtubules stabilization. We show, in SK-N-MC cells and rat striatal sections, that phosphorylation of tau at serines 199-202 and 214 appears to be mediated through activation of calcium-dependent intracellular mechanism, subsequent to D1 receptor-induced cAMP-dependent protein kinase A (PKA). We demonstrate, using pharmacological tools, that PKA activation causes increase of calcium levels, leading to cyclin-dependent kinase 5 activation by calpain proteolysis of p35 to p25 and glycogen synthase kinase 3 β activation by its phosphorylation at tyrosine 216. The D2 receptor agonism or lowering cAMP levels has no effect in our experimental settings. Moreover, we do not observe any association between phosphorylated tau and cellular damage. These data unravel novel mechanisms of tau hyperphosphorylation during G-protein-coupled receptor activation and are the first to show that stimulation of D1 receptors could have a profound influence on the neuronal cytoskeletal constituent tau.

Keywords: Dopamine receptor, tau, calcium, cdk5, GSK3, PKA

6.4 Introduction

Microtubule-associated proteins are cytoskeletal constituents involve in the maintenance of dendritic processes that are known to influence synaptic strength and neuronal plasticity. In mature brain neurons, tau is one of the key microtubule-associated proteins which has been reported to be under the

influence of phosphorylation processes involving, for instance, cAMP-dependent protein kinase A (PKA), cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) activities (Iqbal et al., 2006; Mazanetz et al., 2007). Normally, tau binds directly to microtubules and promotes their polymerization, but it is well-established that increasing tau phosphorylation negatively regulates microtubule-binding and leads to destabilization of the microtubule network, cytoskeletal dysfunction and modification of synaptic plasticity (Iqbal et al., 2006; Mazanetz et al., 2007). Recent studies have demonstrated that activation of dopamine receptors could change synaptic strength and plasticity through the regulation of PKA, cdk5 and GSK3 (Nishi et al., 2000; Cyr et al., 2003; Beaulieu et al., 2004; Beaulieu et al., 2007; Lebel et al., 2007). These observations support the interesting possibility that dopamine receptors might also control tau phosphorylation.

In the present study, therefore, we used selective dopamine receptor agonists and antagonists to analyze the involvement of D1 and D2 receptors in tau phosphorylation and their specific interactions with signaling pathways engage in the regulation of tau. We demonstrate, in SK-N-MC cells and rat striatal sections, that activation of D1, but not D2 receptors, augments tau phosphorylation. We observed, following D1-induced PKA activation, that tau was indirectly phosphorylated via heightened levels of intracellular calcium leading to activation of both cdk5 (through calpain proteolysis of p35 to p25) and GSK3 β (via its phosphorylation at tyrosine 216). Our data reveal novel mechanisms of tau hyperphosphorylation during G-protein-coupled receptor activation and suggest a direct role of D1 dopamine signaling constituents in this process. These mechanisms may be well relevant to non-neurodegenerative conditions involving dopamine neurotransmission.

6.5 Materials and Methods

6.5.1 Materials and reagents

Human SK-N-MC neuroblastoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). These cells expressed functional D1, but not D5- or D2-like dopamine receptors (Sidhu et al., 1999). Sprague-Dawley rats (10 weeks of age) were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). RPMI 1640 medium (without phenol red, L-glutamine and sodium bicarbonate) was purchased from CellGro-Mediatech (Herndon, VA, USA). SKF38393 (a partial D1 receptor agonist), quinpirole (a D2 receptor agonist), SCH23390 (a D1 receptor antagonist) and raclopride (a D2 receptor antagonist) were procured from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Calpeptin, roscovitine, SB216367 and forskolin were bought from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Rp-cAMPS, BAPTA-AM as well as phosphatase and protease inhibitor cocktails were from BioMol (Plymouth, PA, USA). All other chemicals came from Sigma-Aldrich.

6.5.2 Antibodies

Rabbit polyclonal antibody against tau phosphorylated at serine 214, rabbit polyclonal antibody against tau phosphorylated at serines 199-202, mouse monoclonal antibody against the phosphorylated and non phosphorylated form of tau (tau 5), rabbit polyclonal p35 antibody (which also recognizes the p35-cleaved fragment p25), mouse monoclonal cdk5 antibody, rabbit polyclonal GAPDH antibody, rabbit polyclonal GSK3 β antibody against GSK3 β phosphorylated at serine 9 as well as rabbit polyclonal GSK3 α/β antibody against GSK3 α phosphorylated at tyrosine 279 and GSK3 β phosphorylated at tyrosine 216 respectively were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). Rabbit polyclonal antibody against 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element-binding (CREB) protein phosphorylated at serine 133 was from Affinity BioReagent (Golden, CO, USA) and rabbit polyclonal antibody

against CREB was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Goat anti-rabbit or goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody and SuperSignal chemiluminescent substrate kit were obtained from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

6.5.3 Cell culture and treatments

Human neuroblastoma SK-N-MC cells were grown in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂ at 37°C until 70%-80% confluence. They were serum-starved for 12 hours with serum-free RPMI medium before pharmacological treatments lasting 16 hours, unless specified otherwise.

6.5.4 Striatal section preparation

Adult Sprague-Dawley rats (10 weeks old) were anesthetized by inhalation with isoflurane (Baxter Corp., Toronto, ON, Canada) and decapitated. All experiments have been carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health. Their brains were removed and placed in cold cutting buffer containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.3 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose, and saturated with 95% O₂/5% CO₂ (pH=7.4). Six coronal brain sections of 350 µm containing the striatum, 1.70 mm to -0.4 mm from the bregma (Paxinos and Watson, 1998) were sliced with a Vibratome Series 1000 (Vibratome, St. Louis, MO, USA). The sections were then transferred to artificial cerebrospinal fluid containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose, continuously bubbled with 95% O₂/5% CO₂ at 32°C. All treatments were of 3-hour duration, unless specified otherwise. After incubation, the striatum was dissected from the brain sections, and

homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktails.

6.5.5 Western blot analysis

Protein samples extracted from both cultured cells and rat striatal sections were analyzed by Western blotting. The samples were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM), Triton x-100 (1%), sodium deoxycholate (0.25%), protease and phosphatase inhibitor cocktails. Protein concentrations were determined by Bradford assays (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein (40 µg) were separated by SDS/10% PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotted overnight with selective primary antibodies. Primary antibody incubations were followed by several rinses in TBS/0.1% Tween 20 solution before incubation with secondary HRP-conjugated antibodies. Protein bands were visualized by chemiluminescence reactions, and their immunoreactivity was quantitatively analyzed by Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA). The densitometry data were expressed as relative optical density.

6.5.6 Immunocytochemical analysis

After pharmacological treatment, the cells were rinsed and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. They were preincubated in a blocking solution (10% normal goat serum (NGS), 1.2% Triton X-100 in PBS) for 20 minutes at room temperature. The cells were then rinsed and incubated overnight at 4°C in a solution (2% NGS, 1.2% Triton-X-100) containing diluted polyclonal tau antibody, which recognizes protein phosphorylated at serine 214. After 2 washes in PBS, FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was added for 1 hour at room temperature. The cells were then counterstained with the DNA dye Hoechst-33342 (Molecular Probes) for 5 minutes at room temperature to evaluate nuclear integrity. Non-specific immunoreactivity was tested by excluding the primary antibody. Under

these conditions, we did not observe any signal. Nuclei were considered apoptotic when they showed either condensed or fragmented chromatin. The cells were visualized under a IX70 Olympus inverted fluorescence microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA). Images were captured with the SPOT RT advanced digital camera system (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, USA) and Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

6.5.7 Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

Neuronal damage was assessed by the measurement of LDH released in rat striatal sections, with CytoTox 96 non-radioactive assay kit (Promega, Madison, WI, USA). Briefly, at the end of treatment, 50 μ l of medium solution was mixed for 30 minutes at room temperature with 50 μ l of substrate solution in 96-well microplates. The reaction was terminated by adding 50 μ l of stop solution, and absorbance was read at 492 nm within 1 hour in a FLUOStar OPTIMA scanning multi-well spectrophotometer (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA). Absorbance was normalized to protein concentrations in each condition.

6.5.8 Statistical analysis

The data were presented as mean average \pm S.E.M. and analyzed by 1-way anova followed by the post hoc Newman–Keuls test or 2-way ANOVA followed by the post hoc Bonferroni test, using Graph Pad Prism version 5.0 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

6.6 Results

6.6.1 D1 receptor activation induces tau phosphorylation at serine 214 site in SK-N-MC cells

Whether dopamine receptor stimulation leads to tau phosphorylation is unknown. However, the relationship between PKA activation and phosphorylation of tau was demonstrated (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2006). Given that stimulation of D1 receptors activate PKA, we verified in SK-N-MC cells, which endogenously expressed functional D1 receptors, the effect of PKA activation on tau phosphorylation by forskolin as well as by the D1 receptor agonist. The cells were treated with 80 μ M of forskolin or 100 μ M of SKF38393, and changes in tau phosphorylation state were studied by Western blotting, using antibodies directed against tau phosphorylated at serine 214, a site known to be phosphorylated via PKA (Liu et al., 2004). These time and doses were chosen based on previous published studies in which activation of PKA by forskolin or SKF38393 were performed (Sidhu and Fishman, 1990; Brami-Cherrier et al., 2002; Liu et al., 2004; Zhang et al., 2006). Note that a mouse monoclonal antibody against the phosphorylated and non phosphorylated form of (total) tau (tau 5) was also used. Since there were no changes in total tau levels between treatments, phosphorylated tau levels were expressed relative to total tau (tau 5) levels. Moreover, we used GAPDH levels as loading controls. Tau phosphorylation levels were increased by 2.4-fold after forskolin treatment and by 1.8-fold after SKF38393 treatment compared to the controls (Fig. 6.1 A). We next verified the effect of SKF38393 at different times in a second series of experiments, and observed an increase in tau phosphorylation of 1.6-fold at 8 hours and 2.2-fold at 16 hours (Fig. 6.1B). This effect was likely due to PKA activation through D1 receptor stimulation, since it was completely prevented by 30-minute pre-treatment with 10 μ M SCH23390. The D1 receptor antagonist alone had no effect in SK-N-MC cells, in agreement with the fact that the D1 receptor is not constitutively active in these cells (Sidhu and Fishman, 1990; Robinson et al., 2008). Immunofluorescence with the same antibody directed

against tau phosphorylated at serine 214 was analyzed in SK-N-MC cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390 (Fig. 6.1C). Interestingly, D1 receptor activation induced tau phosphorylation in a small number of cells that were not observed in the controls or in cells pre-treated with SCH23390 (Fig. 6.1C). To visualize nuclear integrity, we counterstained D1 receptor agonist-treated cells with Hoechst-33342 and evaluated apoptotic body formation that is characteristic of apoptosis. Tau phosphorylation occurred mainly in healthy, non-apoptotic cells, as opposed to apoptotic cells showing condensed DNA (Fig. 6.1D).

6.6.2 D1 receptor activation induces tau phosphorylation at serine 214 sites in rat striatal sections

To examine whether our data on SK-N-MC cells can be reproduced in a more physiologically-relevant model, we utilized fresh sections of rat striatum, a brain structure bearing high expression levels of postsynaptic D1 and D2 receptors (Weiner et al., 1991). To evaluate PKA activation after D1 receptor stimulation, we measured CREB phosphorylation at serine 133 in rat striatum sections treated for 3 hours, with 100 μ M SKF38393 under continuous oxygenation. This resulted in increased CREB phosphorylation at serine 133 (2.1-fold) compared to the controls (Fig. 6.2A). Considering that 100 μ M SKF38393 was able to induce robust activation of the D1 receptor signaling constituent, namely CREB, and that the same dose was used in cultured cells experiments, we chosen this concentration to study the role of D1 receptors in tau phosphorylation. Treatment of sections with 10 μ M SCH23390 or Rp-cAMPS half an hour prior to SKF38393 completely prevented CREB phosphorylation at serine 133 (Fig. 6.2A). Moreover, treatment of sections with quinpirole (10 μ M) alone or in combination with raclopride (500 nM) did not induce CREB phosphorylation at serine 133. Overall, these results confirmed that D1 receptors were functional in rat striatal sections.

To determine whether tau is phosphorylated after D1 receptor agonist treatment, we performed a time course experiment for up to 6 hours with 100 μ M SKF38393 in rat striatal sections. Tau phosphorylation at serine 214 increased transiently by 2.4-fold after 3 hours of treatment and returned to baseline at 6 hours. This effect was likely due to the activation of D1 receptors, since it was completely prevented by 30-minute pre-treatment with 10 μ M of the D1 receptor antagonist SCH23390 (Fig. 6.2B).

6.6.3 D1 receptor activation induces tau phosphorylation through cdk5 activation in rat striatal sections

Cdk5 is a proline-directed serine threonine kinase that is involved in neuronal function and survival. Cdk5 has been found to mediate phosphorylation of the microtubule-associated protein tau at disease-associated sites (Baumann et al., 1993; Paudel et al., 1993). As a close relationship between D1 receptor stimulation and cdk5 activation is well-documented (Bibb et al., 2001; Cyr et al., 2003; Aubert et al., 2005) we studied tau phosphorylation at known cdk5 sites in rat striatal sections. Western blot analysis was performed on rat striatal section extracts with antibodies directed against tau phosphorylated at serines 199-202, sites modulated by cdk5 and GSK3 activities (Wang et al., 2007). Tau phosphorylation at these serines was significantly increased (1.9-fold) at 3 hours after treatment with 100 μ M SKF38393 (Fig. 6.3A) and returned to basal levels at 6 hours. This effect was completely prevented by 30-minute pre-treatment with 10 μ M SCH23390 (Fig. 6.3A). To ascertain whether the increase in tau phosphorylation at serines 199-202 and serine 214 sites was modulated by D2 dopamine receptor stimulation, we treated slices with the D2 receptor agonist quinpirole alone or in combination with raclopride, a D2 receptor antagonist. We observed that tau phosphorylation at both sites was not modulated by D2 receptor activation (Fig. 6.3B). To evaluate whether tau phosphorylation at serines 199-202 and serine 214 was modulated by PKA activation, we treated striatal sections with 10 μ M of the PKA inhibitor Rp-cAMPS 30 minutes prior to SKF38393. Rp-cAMPS totally prevented tau phosphorylation at serines 199-202

and serine 214 sites (Fig. 6.3C). Together, these results suggested that tau phosphorylation in rat striatal sections occurred through D1 but not D2 receptor stimulation.

The role of cdk5 in tau phosphorylation at serines 199-202 and serine 214 was verified by using 10 μ M roscovitine, a potent cyclin-dependent kinase inhibitor, 30 minutes prior to SKF38393 treatment. Roscovitine completely prevented tau phosphorylation at serines 199-202 and had a slight but no significant effect on tau phosphorylation at serine 214 (Fig. 6.4A). To determine whether tau hyperphosphorylation induced by D1 receptor activation was attributable to increased cdk5, we examined cdk5 levels by Western blotting. We observed no significant changes in cdk5 expression in rat striatal sections with either 100 μ M SKF38393 alone, 100 μ M SKF38393 plus 10 μ M SCH23390 or roscovitine alone (Fig 6.4B). These results suggested that after D1 receptor stimulation, cdk5 levels were not affected in this model.

Cdk5 requires p35, its primary activator, to be active. During neurotoxicity, p35 is cleaved to a truncated form, p25, which is a more potent activator of cdk5 (Lee et al., 2000; Camins et al., 2006). The association of cdk5 with p25 results in deregulation of cdk5 activity, which can lead to tau hyperphosphorylation in various cell lines (Plattner et al., 2006). We therefore assessed the possibility that increased tau phosphorylation may be attributable to a greater number of cdk5/p25 complexes, to the detriment of cdk5/p35 complexes. Using a c-terminal polyclonal antibody that recognizes both p35 and p25, we observed that 100 μ M SKF38393 induced a robust increment of the p25/p35 ratio (4.6-fold) compared to the controls (Fig. 6.4C). Calpain, a calcium-dependent cysteine protease, is regulated by calpastatin, an ubiquitously-expressed endogenous inhibitor (Smith et al., 2006). Calpain is known to mediate proteolysis of the cdk5 activator p35 to its truncated form p25 (Kusakawa et al., 2000; Lee et al., 2000). One factor leading to calpain activation is increased intracellular calcium levels which have been associated with p35 proteolysis (Lee et al., 2000). We evaluated the effects of the calpain inhibitor calpeptine,

the intracellular calcium chelator BAPTA-AM and the PKA inhibitor Rp-cAMPS on the p25/p35 ratio in rat striatal sections treated with SKF38393. Western blot analysis revealed that pre-treatment with 10 μ M calpeptine, 10 μ M BAPTA-AM or 100 μ M Rp-cAMPS prevented the increase in the p25/p35 ratio induced by SKF38393 (Fig. 6.4D). Moreover, calpeptine and BAPTA-AM treatments completely abolished tau phosphorylation induced by SKF38393 at serines 199-202 (Fig. 6.4E). Note that a treatment with roscovitine, calpeptine or BAPTA-AM alone has no effect on p25/p35 ratio or levels of p-tau. Altogether, these results suggested that cdk5 played a central role in tau phosphorylation by the D1 receptor agonist, since this process was reversed by direct and indirect cdk5 inhibitors, namely, roscovitine and calpeptine, and by preventing increases in intracellular calcium levels through BAPTA-AM or PKA inhibitor Rp-cAMPS.

6.6.4 D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation through GSK3 β activation in rat striatal sections

GSK3 is another major kinase that has been identified to mediate tau hyperphosphorylation (Mandelkow et al., 1992; Paudel et al., 1993). Its activity is known to be regulated by phosphorylation of serine and tyrosine sites. GSK3 inhibition was associated with phosphorylation of serine 9 on GSK3 β or serine 21 on GSK3 α , whereas its activation was related to phosphorylation of tyrosine 216 on GSK3 β or tyrosine 279 on GSK3 α isoforms (Jope and Johnson, 2004). Western blot analyses were performed with antibodies directed against GSK3 α/β phosphorylated at serine 21/9 or tyrosine 279/216, to verify the levels of inactivated and activated GSK3 forms respectively after D1 receptor activation. SKF38393 did not affect GSK3 β phosphorylation at serine 9 but induced a significant increase of phosphorylation at tyrosine 216 (Fig. 6.5A) compared to control levels. GSK3 α phosphorylation levels were not affected by SKF38393 treatments. The increment of GSK3 β phosphorylation was evoked in part by D1 receptor stimulation as it was prevented by pre-treatment with 10 μ M SCH23390 (Fig 6.5A).

To assess a possible role of GSK3 in tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation, we used the well-known GSK3 inhibitor SB216367 (Hartigan and Johnson, 1999). We observed that 10 μ M of SB216367 completely prevented tau phosphorylation at serines 199-202 but not at serine 214 (Fig. 6.5B). GSK3-dependent tau phosphorylation has been reported to be modulated by intracellular calcium levels (Hartigan and Johnson, 1999). To determine the involvement of PKA and intracellular calcium in D1 induced-GSK3 β activation, we performed western blot analysis on cells treated with SKF38393 in combination with the PKA inhibitor Rp-cAMPS or the intracellular calcium chelator BAPTA-AM. Pre-treatment of cells with 100 μ M Rp-cAMPS or 10 μ M BAPTA-AM totally prevented GSK3 β phosphorylation at tyrosine 216 (Fig. 6.5C). These results suggested that D1 receptor activation was responsible for GSK3 β activation and that PKA-dependent signaling pathways, leading to elevated intracellular calcium levels, were involved in this process.

6.6.5 D1 receptor stimulation and tau phosphorylation are not associated with cellular damage in rat striatal sections

Recent evidence suggests that selective D1 receptor activation could be involved in neurodegenerative processes and that blockade of D1 dopamine receptors with selective antagonists has neuroprotective effects (Chen et al., 2003; Chen et al., 2004; Moussa et al., 2006; Lebel et al., 2007). To investigate whether D1 receptor agonists affect cell viability, we performed LDH cytotoxicity assays on rat striatal sections. We measured LDH release after 3 hours of treatment with SKF38393 alone or in combination with SCH23390, roscovetine, SB216367, Rp-cAMPS or BAPTA-AM. The treatments also included quinpirole alone or in combination with raclopride. None of them modified LDH levels compared to the controls (Fig. 6.6). These results suggested that dopamine receptor activation, which leads to abnormal tau phosphorylation, did not induce quantifiable cellular damage.

6.7 Discussion

The present study demonstrates a novel molecular chain of events that links D1 receptor activation to abnormal tau phosphorylation. D1 receptor agonist phosphorylates tau in a time-dependent manner, whereas D2 receptor agonism has no effect. Tau phosphorylation is transient in rat striatal sections and returns to basal levels within 6 hours, but slowly increases in SK-N-MC cells and reaches statistical significance at 16 hours. It is clear that these divergences reflect the cellular nature of the experimental conditions between post-mitotic neurons from fresh brain sections and dividing cells in culture. Nonetheless, we observed in both model that tau phosphorylation by D1 receptor activation is triggered by a PKA-dependent elevation in intracellular calcium levels and activation of cdk5 and GSK3 kinases (Fig. 6.7).

Our first original observation is that D1 receptor stimulation is able to activate PKA strongly enough to induce tau phosphorylation. While it has been documented that the robust PKA activator forskolin and the adrenergic receptor agonist isoproterenol increase tau phosphorylation (Liu et al., 2004; Sengupta et al., 2006; Zhang et al., 2006), this is the first report connecting dopamine receptors with tau phosphorylation. We believe that D1 receptors are responsible for tau phosphorylation because dopamine receptor antagonism can prevent this effect in both SK-N-MC cells and rat striatal sections. Besides, as D1 receptor activation increases cAMP levels and activates PKA (Missale et al., 1998), the fact that the PKA inhibitor Rp-cAMPS prevents tau phosphorylation induced by D1 receptor agonism is additional proof involving activation of D1 receptor signaling. Note that in SK-N-MC cells, with the exception of the D1 receptor, there is no evidence of the expression of other functional dopamine receptors; the D1-like receptor D5 is not expressed in these cells (Sidhu et al., 1999). This also indicates that D1 receptor activation is directly responsible for these effects. In rat striatal sections, however, our experimental conditions cannot rule out the possibility that tau phosphorylation may be indirectly due to the release of other neurotransmitters, such as glutamate, present in the

striatum. For example, this could be associated with activation of D1 receptors on striatal projection neuronal pathways, such as the glutamatergic corticostriatal pathway, or D1 receptors on striatal pre-synaptic terminals (Wu et al., 2006). Nonetheless, the fact that D1 receptor stimulation displays the same effects on tau phosphorylation in SK-N-MC cells and rat striatal sections suggests the direct involvement of D1 receptors at striatal neurons.

D2 receptor activation has no effect on tau phosphorylation. Typically, the physiological actions of dopamine receptors are associated with PKA regulation. The D1 class of receptors (D1 and D5 receptors) couple mostly to G_s and stimulate production of the second messenger cAMP. In contrast, the D2 class of receptors (D2, D3 and D4 receptors) couple to $G_{i/o}$ and negatively regulate cAMP production, which decreases general PKA activation (Missale et al., 1998). As tau phosphorylation appears to be modulated following PKA activation in our experiments on brain sections, it is not surprising that D2 receptor stimulation is without effect. Other evidence in accordance with this statement is that inhibiting PKA itself has no significant impact on tau phosphorylation (data not shown). Therefore, lowering general PKA activation, either through activation of D2 receptors or with a selective PKA inhibitor, has no action on phosphorylated tau levels.

Another interesting result is that D1 receptor activation is associated with increased tau phosphorylation at serines 199 and 202. In our experiments, cdk5 inhibition by roscovitine totally prevented the phosphorylation of these serines after D1 receptor activation. Note that tau phosphorylation at serine 214 site was only partially prevented by roscovitine. This is consistent with the fact that PKA activity is not affected by this inhibitor and therefore, could still phosphorylate tau at this site (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2006). Tau phosphorylation at serines 199 and 202 by cdk5 is well-documented (Tsai et al., 2004). For instance, under neurotoxic conditions that include ischemic damage and β -amyloid treatment, cdk5 activity is deregulated when p35 is cleaved proteolytically by the protease calpain, generating p25 activators (Lee et al., 2000; Plattner et al., 2006). The

generation and accumulation of p25 transforms cdk5 into an 'hyperactive' kinase that is associated with tau hyperphosphorylation. In our models, cdk5 levels are not affected by D1 receptor stimulation, but p25 levels are increased. Use of indirect cdk5 inhibitors, such as the calpain inhibitor calpeptine and the intracellular calcium chelator BAPTA-AM, respectively demonstrates the occurrence of calpain proteolysis of p35 to its truncated form p25 and enhanced levels of intracellular calcium. We, therefore, propose that cdk5 is abnormally activated under D1 receptor stimulation, through heightened calpain activity as a result of elevated intracellular calcium levels. We and others have established that increased dopamine levels *in vivo*, induced pharmacologically or genetically, are associated with enhanced striatal cdk5 levels and activity (Bibb et al., 2001; Cyr et al., 2003; Aubert et al., 2005; Lebel et al., 2007). Our previous study on dopamine transporter knockout mice revealed that, in addition, enhanced cdk5 activity was linked with augmented tau phosphorylation (Cyr et al., 2003). Whether heightened cdk5 activity or tau hyperphosphorylation was due to dopamine receptor activation was unclear in these experiments. Here, we established that selective activation of D1 receptors, but not D2 receptors, is responsible for elevated p25 levels, presumably leading to over-activated cdk5 and tau hyperphosphorylation.

Our study indicated that GSK3 β is another kinase that plays a role in tau phosphorylation at serines 199 and 202 after D1 receptor activation. GSK3 inhibition by SB216367 totally prevented tau phosphorylation at these serines. However, serine 214 site was only partially prevented by SB216367 suggesting the contribution of PKA activation, which is not affected by this inhibitor. We also demonstrated that stimulation of D1 receptors increased GSK3 β activity, as shown by augmented levels of phosphorylated GSK3 β at tyrosine 216, a phosphorylation site known to modulate GSK3 β activation (Joje and Johnson, 2004). Interestingly, GSK3 β activation, like the cdk5 activation described previously, seemed to be mediated by intracellular calcium as BAPTA-AM also prevented enhanced GSK3 β phosphorylation after D1 receptor stimulation. In

the literature, GSK3 β is clearly activated by elevated intracellular calcium levels, leading to tau hyperphosphorylation (Hartigan and Johnson, 1999). On the other hand, GSK3 β could also be activated by D2 dopamine receptors, through a cAMP-independent mechanism that includes a β -arrestin2-mediated pathway (Beaulieu et al., 2004; Beaulieu et al., 2005; Beaulieu et al., 2006). In these studies though, phosphorylated tau levels were not assessed. It would be interesting to investigate the possibility that this pathway, proposed to lead to so-called long-term dopamine-dependent behaviours, could also involve tau phosphorylation. However, they do not concur with our experiments, indicating a role for D1 rather than D2 receptors. The short-term nature of our experimental conditions may underlie this discrepancy. On the other hand, in SK-N-MC cells, treatment with the D1 receptor partial agonist SKF38393 causes phosphorylation of ERK1/2 which, in turn, forms stable heterotrimeric complexes with the D1 dopamine receptor and β -arrestin2 (Chen et al., 2004). Whether the latter complex also leads to GSK3 β activation is unknown, but still represents an interesting possibility. The link between stimulation of D1 receptors, intracellular calcium levels and GSK3 β activation described in our study definitively requires further investigation.

Intracellular calcium levels seem to be fundamental to the regulation of cdk5 and GSK3 β activities after D1 receptor activation. Our data suggests that the calcium concentration achieved after D1 receptor activation is quite high as calpain and GSK3 β are activated. Low calcium concentration is rather associated with GSK3 β inactivation through the phosphoinositide-3-kinase/Akt kinase cascade and no calpains activity (Papadia and Harkingham, 2007). But how could D1 receptor activation possibly lead to increased intracellular calcium levels? *In vivo*, glutamate ligand-gated calcium ion channels and voltage-gated calcium ion channels are PKA target proteins too (Surmeier et al., 2007; Kisilevsky et al., 2008). They are activated when phosphorylated by PKA, thus resulting in calcium influx. This has been well-demonstrated in neurons receiving simultaneous inputs from the glutamatergic and dopaminergic systems, such as

striatal medium spiny neurons (Cepeda and Levine, 2006). We therefore propose that following D1 receptor stimulation, PKA could phosphorylate calcium ion channels leading to calcium influx inducing sustained phosphorylation of CREB at serine 133, over-activation of cdk5 through calpain-mediated cleavage of p35 and GSK3 β activation through its phosphorylation at tyrosine 216. Activation of PKA, cdk5 and GSK3 β will lead to tau phosphorylation.

D1-stimulated PKA-dependent phosphorylation of substrates is a relatively rapid event in neurons. In that context, our time course data is somewhat puzzling considering that the highest levels of phosphorylated tau are achieved at 3 hours. It is noteworthy, however, that sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites (from 1 to 3 days) have been shown following PKA activation in both cell culture and mice (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2006). This suggests that D1 receptor activation initiates a molecular chain of events that required some time in order to lead to hyperphosphorylation of tau. For instance, desensitization of the D1 receptor after prolonged treatment with agonist could be one possibility. It has been demonstrated that stimulation of D1 receptor lead to ERK activation which was found to form stable heterotrimeric complexes with the D1 receptor and β -arrestin2, an important molecular determinant in receptor-desensitization, during internalisation (Chen et al., 2004). At the same time, ERK/MAPK activation has been reported to lead to chronic hyperphosphorylation of tau (Amadoro et al., 2006). Whether this latter complex also leads to hyperphosphorylation of tau is unknown, but still represents an interesting possibility. In fact, we have demonstrated that hyperphosphorylation of tau is intimately dependent of the elevation of calcium following D1 dopamine receptor activation. We assume that the calcium concentration achieved after D1 receptor activation is very high because the activation of calpain and GSK3 β do not depend on calcium/calmodulin dependent signalling, but are rather activated by calcium directly and require higher levels to be fully induced (Hartigan and Johnson, 1999). We therefore speculate that this high level of

intracellular calcium could required longer time to be achieved. The fact that CREB phosphorylation is sustained for up to 3 hours in our experiment support the hypothesis of higher intracellular calcium levels. Whether the elevation of calcium comes from intracellular stores or the opening of the glutamate receptors will require further experiments but the interaction between D1 and glutamate receptors has been well characterized (Cepeda and Levine, 2006).

In addition to the physiological role that tau phosphorylation plays in neurons, hyperphosphorylated tau is at the core of paired helical filament structures that define a major portion of the cellular pathology in Alzheimer's disease and other dementias (Iqbal et al., 2006; Mazanetz et al., 2007; Wang et al., 2007). It has been established that site-specific tau phosphorylation can potentially lead to neuronal dysfunction and even cell death when dysregulated in long-term conditions (Stoothoff and Johnson, 2005). However, D1 receptor activation did not affect cell viability in rat striatal sections, suggesting that the transient phosphorylation of tau at 3 hours is not associated with cellular damage in these conditions. Our immunofluorescence study performed on SK-N-MC cells also points to this idea. It reveals that phosphorylated tau is located in healthy cells (no sign of condensed DNA) and does not display an aggregated phenotype. The phosphorylated tau positive signals induced by D1 receptor activation are heterogenous in SK-N-MC cells. We believe that this phenomenon could be explained in part by the intrinsic nature of these mitotic cells that are not entirely at the same division phase at the same time. It is thus expected that the D1 receptors expression levels will vary from cell to cell. These data are in agreement with our previous experiments on mice with persistently-elevated extracellular dopamine resulting from inactivation of the dopamine transporter gene. In these mice, hyperphosphorylated tau is located in the cytoplasm of striatal cells in soluble form, and is decreased by lowering dopamine levels (Cyr et al., 2003). Interestingly, tau phosphorylation is still tightly associated with striatal dysfunction and motor impairment in these mice (Cyr et al., 2003; Cyr et al., 2005), which underscores the importance of tau in stabilization of the microtubule network and modification of neuronal activity.

Altogether, these results suggest that dopamine receptor activation has a profound influence on tau phosphorylation. This is important as changes in dopamine levels in the brain have been associated with modification of cytoskeletal organization (Allen et al., 2006; Lebel et al., 2007). For example, our data may have implication in non-neurodegenerative diseases such as levodopa induced dyskinesia (LID) as overactivity of the D1 receptor pathway is suspected in this disease (Bezard et al., 2001; Calon et al. 2003; St-Hilaire et al., 2005). Whether there is an outcome on neuronal activity or survival is, however, still an open question. It is clear though that PKA, cdk5 and GSK3 are key mediators of tau hyperphosphorylation induced by direct D1 receptor activation.

Acknowledgment

We thank Geneviève Bureau for helpful discussions. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant 311763-07 to MC and Grant 105942-08 to GM), the Parkinson Society of Canada (MC), and the Canada Research Chair in Molecular Neuropharmacology (MC).

6.8 References

- Allen, P. B., Zachariou, V., Svenningsson, P., Lepore, A. C., Centonze, D., Costa, C., Rossi, S., Bender, G., Chen, G., Feng, J., Snyder, G. L., Bernardi, G., Nestler, E. J., Yan, Z., Calabresi, P., Greengard, P., 2006. Distinct roles for spinophilin and neurabin in dopamine-mediated plasticity. *Neuroscience* 140, 897-911.
- Amadoro, G., Ciotti, M. T., Costanzi, M., Cestari, V., Calissano, P., Canu, N. 2006. NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 2892-2897
- Aubert, I., Guigoni, C., Hakansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B. H., Gross, C. E., Fisone, G., Bloch, B., Bezard, E., 2005. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57, 17-26.
- Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., Mandelkow, E., 1993. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336, 417-424.
- Beaulieu, J. M., Tirotta E, Sotnikova, T.D., Masri, B., Salahpour, A., Gainetdinov, R. R., Borrelli, E. and Caron, M. G., 2007. Regulation of Akt signaling by D3 and D3 dopamine receptors in vivo. *J Neurosci* 27, 881-885.
- Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., 2006. Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. *J Biol Chem* 281, 32072-32080.
- Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Marion, S., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., 2005. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122, 261-273.
- Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Yao, W. D., Kockeritz, L., Woodgett, J. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., 2004. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5099-5104.
- Bezard, E., Brotchie, J.M. and Gross, C.E. 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nature Review Neuroscience* 2, 577-588.
- Bibb, J. A., Chen, J., Taylor, J. R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G. L., Yan, Z., Sagawa, Z. K., Ouimet, C. C., Nairn, A. C., Nestler, E. J., Greengard, P., 2001. Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410, 376-380.

Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M., Pages, C., Hipskind, R.A. and Caboche, J. 2002. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci.* 22, 8911-8921.

Calon, F., Morissette, M., Rajput, A. H., Hornykiewicz, O., Bedard, P. J., Di Paolo, T., 2003. Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov Disord* 18, 241-253.

Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., Canudas, A. M., Pallas, M., 2006. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect* 19, 453-460.

Cepeda, C., Levine, M. S., 2006. Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Sci STKE* 2006, pe20.

Chen, J., Rusnak, M., Luedtke, R. R., Sidhu, A., 2004. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J Biol Chem* 279, 39317-39330.

Chen, J., Wersinger, C., Sidhu, A., 2003. Chronic stimulation of D1 dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastoma cells induces nitric-oxide synthase activation and cytotoxicity. *J Biol Chem* 278, 28089-28100.

Cyr, M., Caron, M. G., Johnson, G. A., Laakso, A., 2005. Magnetic resonance imaging at microscopic resolution reveals subtle morphological changes in a mouse model of dopaminergic hyperfunction. *Neuroimage* 26, 83-90.

Cyr, M., Beaulieu, J. M., Laakso, A., Sotnikova, T. D., Yao, W. D., Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., 2003. Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11035-11040.

Hartigan, J. A., Johnson, G. V., 1999. Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 β -dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 21395-21401.

Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I., 2006. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J alzheimers disease* 9, 219-242.

Jope, R. S., Johnson, G. V., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29, 95-102.

Kisilevsky, A. E., Mulligan, S. J., Altier, C., Iftinca, M. C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B. A., Zamponi, G. W., 2008. D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* 58, 557-570.

Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., Hisanaga, S., 2000. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* 275, 17166-17172.

Lebel, M., Robinson, P., Cyr, M., 2007. Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci* 34, 18-29.

Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., Tsai, L. H., 2000. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364.

Liu, S. J., Zhang, J. Y., Li, H. L., Fang, Z. Y., Wang, Q., Deng, H. M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wang, J. Z., 2004. Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem* 279, 50078-50088.

Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R., Mandelkow, E., 1992. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314, 315-321.

Mazanetz, M. P., Fischer, P. M., 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6, 464-479.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78, 189-225.

Moussa, C. E., Tomita, Y., Sidhu, A., 2006. Dopamine D1 receptor-mediated toxicity in human SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 48, 226-234.

Nishi, A., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Higashi, H., Nairn, A.C. and Greengard, P. 2000. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12840-12845.

Papadia, S. and Hardingham, G.E. 2007. The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist* 13, 572-9.

Paudel, H. K., Lew, J., Ali, Z., Wang, J. H., 1993. Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem* 268, 23512-23518.

Paxinos, G. and Watson, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. Academic Press, New York.

Plattner, F., Angelo, M., Giese, K. P., 2006. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 281, 25457-25465.

Robinson, P., Lebel, M., Cyr, M., 2008. Dopamine D1 receptor-mediated aggregation of N-terminal fragments of mutant huntingtin and cell death in a neuroblastoma cell line. *Neuroscience* 153, 762-772.

Sengupta, A., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2006. Regulation of phosphorylation of tau by protein kinases in rat brain. *Neurochem Res* 31, 1473-1480.

Sidhu, A., Fishman, P. H., 1990. Identification and characterization of functional D1 dopamine receptors in a human neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 574-579.

Sidhu, A., Olde, B., Humblot, N., Kimura, K., Gardner, N., 1999. Regulation of human D1 dopamine receptor function and gene expression in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuroscience* 91, 537-547.

Smith, P. D., Mount, M. P., Shree, R., Callaghan, S., Slack, R. S., Anisman, H., Vincent, I., Wang, X., Mao, Z., Park, D. S., 2006. Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci* 26, 440-447.

St-Hilaire, M., Landry, E., Levesque, D., Rouillard, C., 2005. Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 20, 450-460.

Stoothoff, W. H., Johnson, G. V., 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 1739, 280-297.

Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W., 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30, 228-235.

Tsai, L.H., Lee, M.S, and Cruz, J., 2004. Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochimica and biophysica acta* 1697,137-142.

Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K., 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European journal of neuroscience* 25, 59-68.

Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Brann, M. R., 1991. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1859-1863.

Wu, J., Dougherty, J. J., Nichols, R. A., 2006. Dopamine receptor regulation of Ca^{2+} levels in individual isolated nerve terminals from rat striatum: comparison of presynaptic D1-like and D2-like receptors. *J Neurochem* 98, 481-494.

Zhang, Y., Li, H. L., Wang, D. L., Liu, S. J., Wang, J. Z., 2006. A transitory activation of protein kinase-A induces a sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites in N2a cells-imply a new mechanism in Alzheimer pathology. *J Neural Transm* 113, 1487-1497.

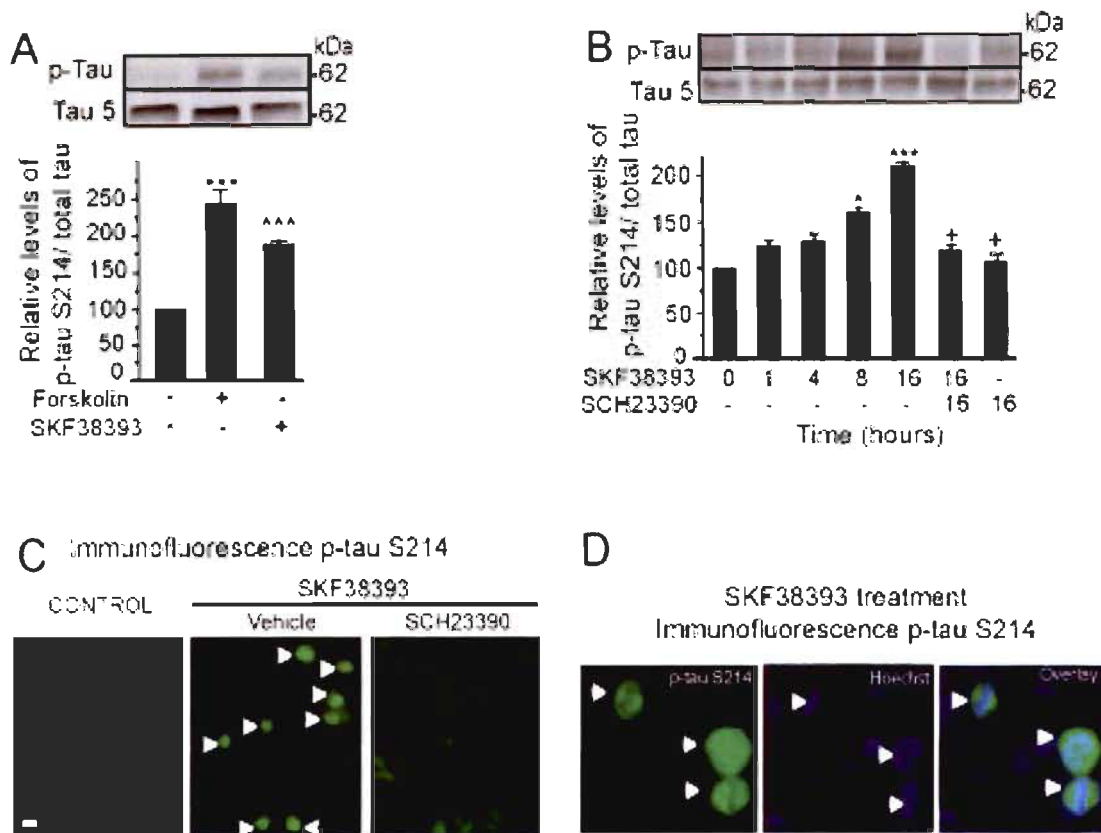


Figure 6.1 : D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation at PKA sites in SK-N-MC cells

Protein levels were evaluated by Western blotting of cell extracts (40 μ g protein) from SK-N-MC cells treated for 16 hours. (A) Phosphorylated tau levels at serine 214, expressed relative to total tau (tau 5) levels, were measured in SK-N-MC cells treated with 80 μ M of the PKA activator forskolin or 100 μ M SKF38393. (B) Phosphorylated tau levels at serine 214 were measured in SK-N-MC cells treated with 100 μ M SKF38393, a combination of 100 μ M SKF38393 and 10 μ M SCH23390 or 10 μ M SCH23390 alone for periods ranging from 0 to 16 hours. The data are expressed relative to total tau levels. Western blot data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n=4$ quadruplicate/treatment. *** $p<0.001$ and * $p<0.05$ vs untreated control and + $p<0.001$ vs 16 hours treatment with SKF38393. The data were analyzed by 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman-Keuls test, in (A) $F_{2,24} = 113.7$ $P<0.0001$ and in (B) $F_{6,28} = 30.2$ $P<0.0001$. (C)

Representative examples of immunofluorescence images of study on SK-N-MC cells treated for 16 hours with 100 μ M SKF38393 or a combination of 100 μ M SKF38393 and 10 μ M SCH23390, using antibodies raised against tau phosphorylated at serine 214. (D) Examples of double immunofluorescence study with antibodies raised against tau phosphorylated at serine 214 (green) and the DNA marker Hoechst 33342 (blue) in SK-N-MC cells treated with 100 μ M SKF38393. Arrows show SK-N-MC cells positive for phosphorylated tau at serine 214. The scale bar represents 20 μ m.

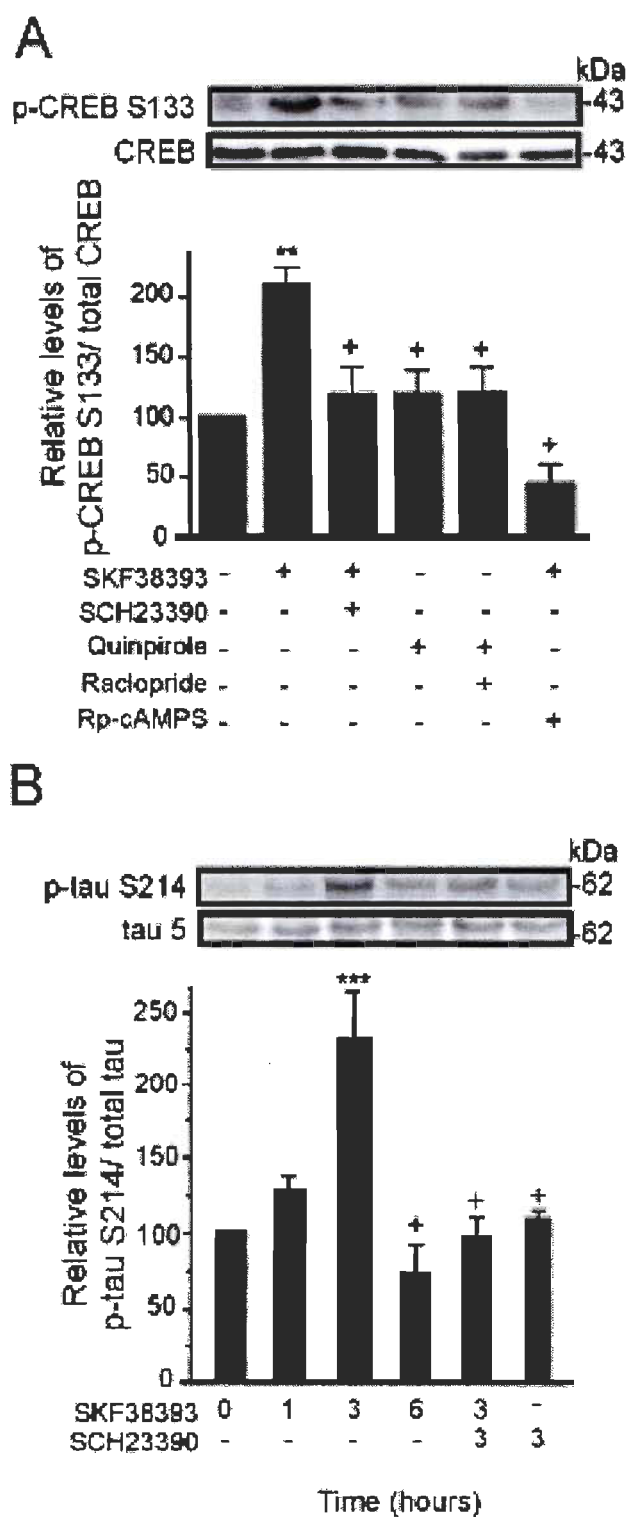


Figure 6.2 : D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation at PKA sites in rat striatal sections

Protein levels were evaluated by Western blotting of proteins extracted (40 μ g protein) from the striatum of rat brain sections. (A) Phosphorylated CREB levels at serine 133 were assessed on sections treated for 3 hours with 100 μ M of the D1 receptor partial agonist SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the D1 receptor antagonist SCH23390 or 100 μ M of the PKA inhibitor Rp-cAMPS. Striatal sections were also treated with 10 μ M of the D2 receptor agonist quinpirole alone or in combination with 500 nM of the D2 receptor antagonist raclopride. The data are expressed relative to total CREB levels. (B) Phosphorylated tau levels at serine 214 were evaluated on sections treated with 100 μ M SKF38393 alone at different times or in combination with 10 μ M SCH23390 at 6 hours. The effect of treatment with 10 μ M SCH23390 was also investigated. The data, expressed relative to total tau levels, represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n=3$ triplicate/treatment. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$ vs the respective untreated controls and * $p<0.001$ vs respective 100 μ M SKF38393 treatment alone at 3 hours. The data were analyzed by 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman–Keuls test, in (A) $F_{5,12} = 10.3$ $P<0.0005$ and in (B) $F_{5,30} = 19.2$ $P<0.0001$.

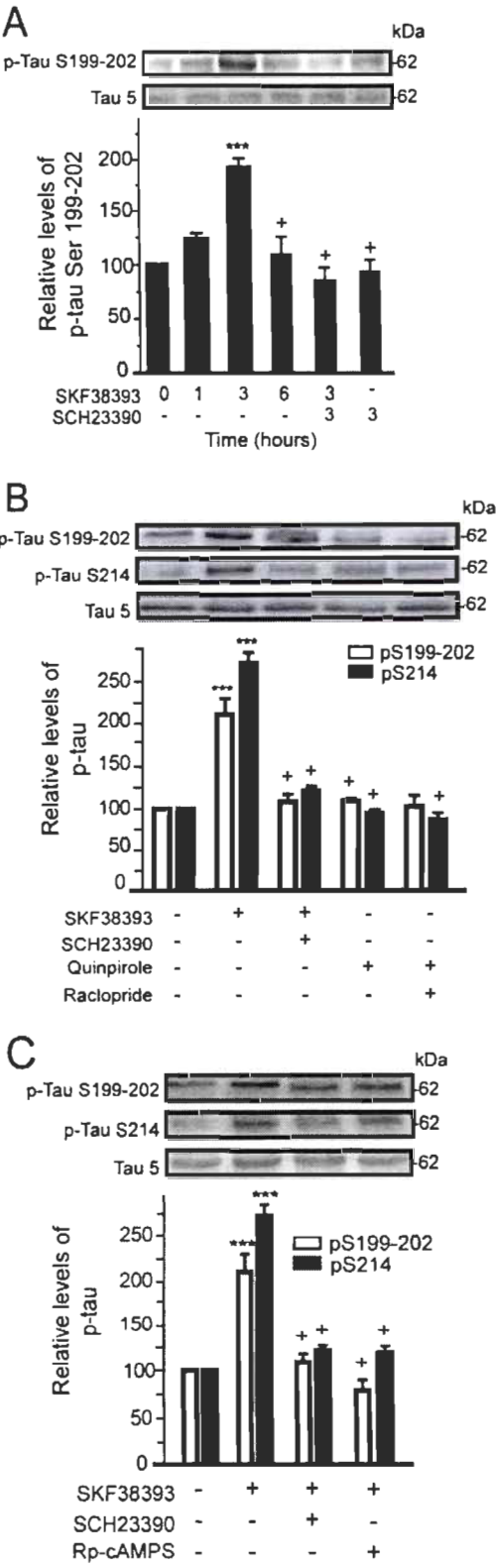


Figure 6.3 : D1 receptor stimulation induces tau phosphorylation at cdk5/GSK3 sites in rat striatal sections

Protein levels were evaluated by Western blotting of protein extracted (40 μ g protein) from the striatum of rat brain sections. (A) Phosphorylated tau levels at serine 199-202 were assessed on sections treated at different times with 100 μ M of the D1 receptor partial agonist SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the D1 receptor antagonist SCH23390. The data are expressed relative to total tau levels and were analyzed by 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman–Keuls test, $F_{5,36} = 25.8$ $P < 0.0001$ (B) Phosphorylated tau levels at serines 199-202 and serine 214 were evaluated on sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390 at 3 hours. Sections were also treated with 10 μ M quinpirole alone or in combination with 500 mM raclopride. The data are expressed relative to total tau levels and were analyzed by 2-way ANOVA followed by the post hoc Bonferroni test. There was a main effect of treatments $F_{4,50} = 129.9$ $P < 0.0005$, no effect of phosphorylation site of tau $F_{1,50} = 1.0$ $P = 0.3194$, and a significant interaction between treatments and phosphorylation site of tau $F_{4,50} = 6.6$ $P < 0.0001$. (C) Phosphorylated tau levels at serine 199-202 and serine 214 were evaluated on rat striatal sections treated for 3 hours with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390 or 100 μ M of the PKA inhibitor Rp-cAMPS. Data were analyzed by 2-way ANOVA followed by the post hoc Bonferroni test. There was a main effect of treatments $F_{3,36} = 424.7$ $P < 0.0001$, an effect of phosphorylation site of tau $F_{1,36} = 24.0$ $P < 0.0005$, and a significant interaction between treatments and phosphorylation site of tau $F_{3,36} = 12.8$ $P < 0.0001$. The data, expressed relative to total tau levels, represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n=3$ triplicate/treatment. *** $p < 0.001$ vs respective untreated controls and $^+p < 0.001$ vs respective 100 μ M SKF38393 treatment alone at 3 hours.

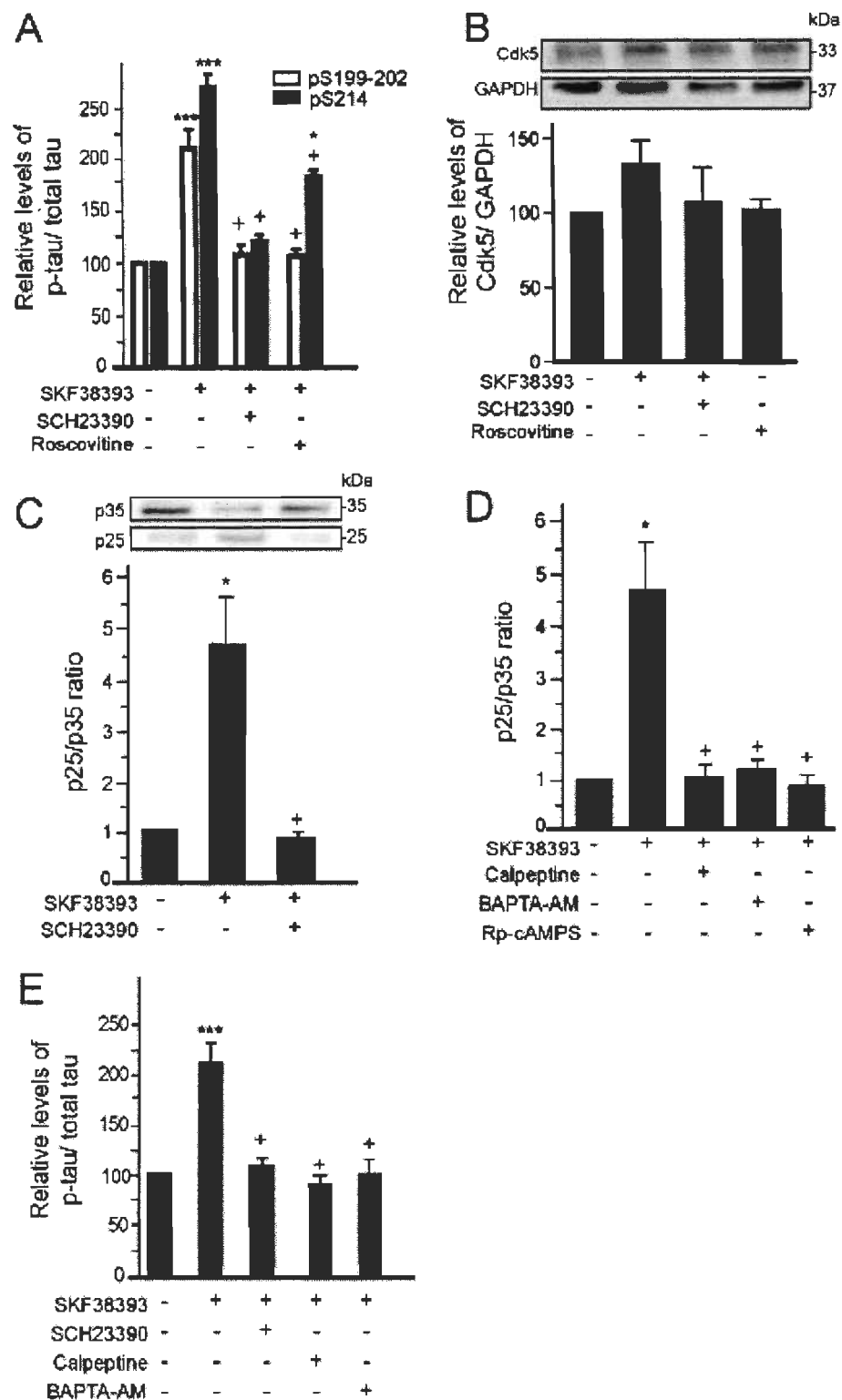


Figure 6.4 : Cdk5 plays a role in tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation in rat striatal sections

Protein levels were evaluated by Western blotting of protein extracted (40 μ g protein) from the striatum of rat brain sections. (A) Phosphorylated tau levels at serines 199-202 and serine 214 were evaluated on rat striatal sections treated for 3 hours with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390 or 10 μ M of the cdk5 inhibitor roscovitine. The data are expressed relative to total tau levels. (B) Cdk5 expression was evaluated on rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390 or 10 μ M roscovitine. These data are expressed relative to GAPDH levels. (C) The p25/p35 ratio was determined on rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390. (D) This ratio was also determined when rat striatal sections were treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the calpain inhibitor calpeptine, 100 μ M of intracellular calcium chelator BAPTA-AM or 100 μ M of the PKA inhibitor Rp-cAMPS. The data are expressed relative to GAPDH levels. (E) Phosphorylated tau levels at serine 199-202 were evaluated on rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390, 10 μ M calpeptine or 100 μ M BAPTA-AM. The data, expressed relative to total tau levels, represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n=3$ triplicate/treatment. *** $p<0.001$ and * $p<0.05$ vs the respective controls and $^+p<0.001$ vs respective 100 μ M SKF38393 treatment alone. The data in (A) were analyzed by 2-way ANOVA followed by the post hoc Bonferroni test. There was a main effect of treatments $F_{3,12} = 73.1$ $P<0.0001$, an effect of phosphorylation site of tau $F_{1,12} = 19.5$ $P<0.01$, and a significant interaction between treatments and phosphorylation site of tau $F_{3,12} = 6.4$ $P<0.01$. The other data were analyzed by 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman–Keuls test, (B) $F_{3,24} = 1.5$ $P=0.2484$, (C) $F_{2,15} = 26.9$ $P<0.0001$, (D) $F_{4,25} = 24.6$ $P<0.0001$ and in (E) $F_{4,10} = 14.9$ $P<0.0005$.

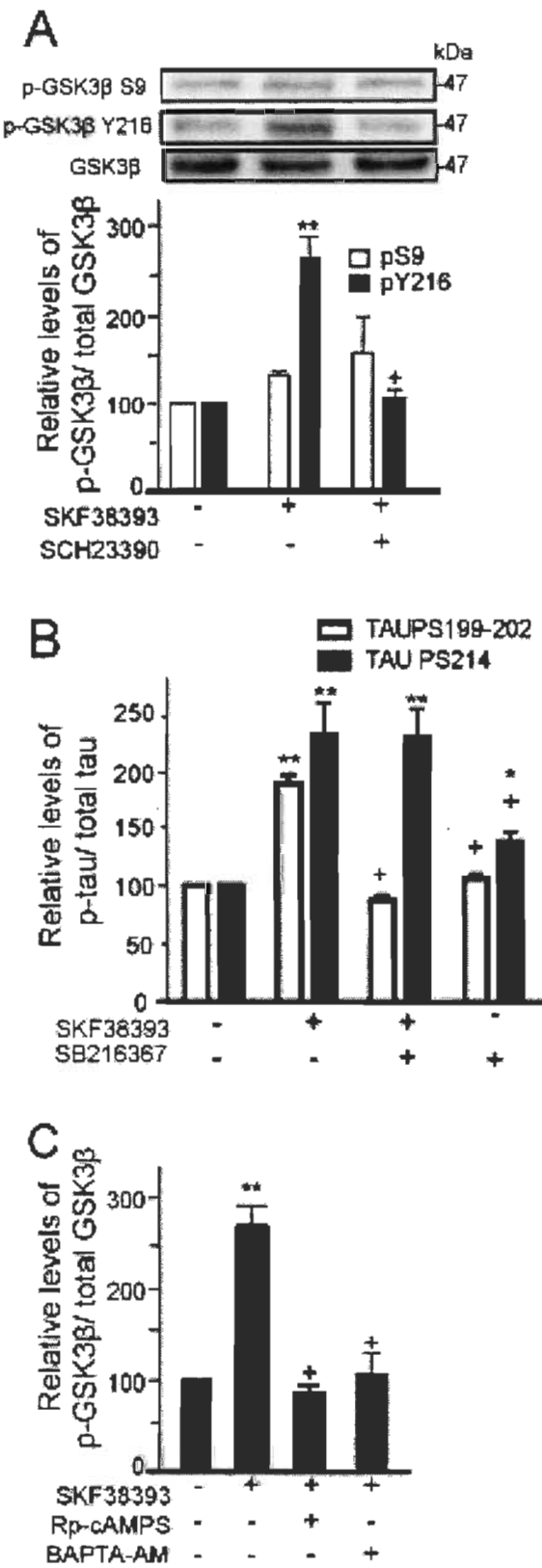


Figure 6.5 : GSK3 plays a role in tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation in rat striatal sections

Protein levels were evaluated by Western blotting of protein extracted (40 μ g protein) from the striatum of rat brain sections. (A) Phosphorylated GSK3 β levels at serine 9 or tyrosine 216 were measured in rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390. The data are expressed relative to total GSK3 β levels. (B) Phosphorylated tau levels at serines 199-202 and serine 214 were evaluated in rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the GSK3 β inhibitor SB216367. The data are expressed relative to total tau levels. (C) Phosphorylated GSK3 β levels at tyrosine 216 were measured in rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 100 μ M Rp-cAMPS or 100 μ M BAPTA-AM. These data, expressed relative to total GSK3 β levels, represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm S.E.M., $n=3$ triplicate/treatment. ** $p<0.01$ and * $p<0.05$ vs the respective controls, $^+p<0.001$ vs respective 100 μ M SKF38393 treatment alone. The data in (A) and (B) were analyzed by 2-way ANOVA followed by the post hoc Bonferroni test. In (A), there was a main effect of treatments $F_{2,12} = 41.1$ $P<0.0005$, an effect of phosphorylation site of GSK3 β $F_{1,12} = 9.7$ $P<0.02$, and a significant interaction between treatments and phosphorylation site of GSK3 β $F_{2,12} = 6.4$ $P<0.001$. In (B), there was a main effect of treatments $F_{3,16} = 35.3$ $P<0.0001$, an effect of phosphorylation site of tau $F_{1,16} = 33.4$ $P<0.0001$, and a significant interaction between treatments and phosphorylation site of tau $F_{3,16} = 22.8$ $P<0.0001$. Data in (C) were analyzed by 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman–Keuls test $F_{3,20} = 80.3$ $P<0.0001$.

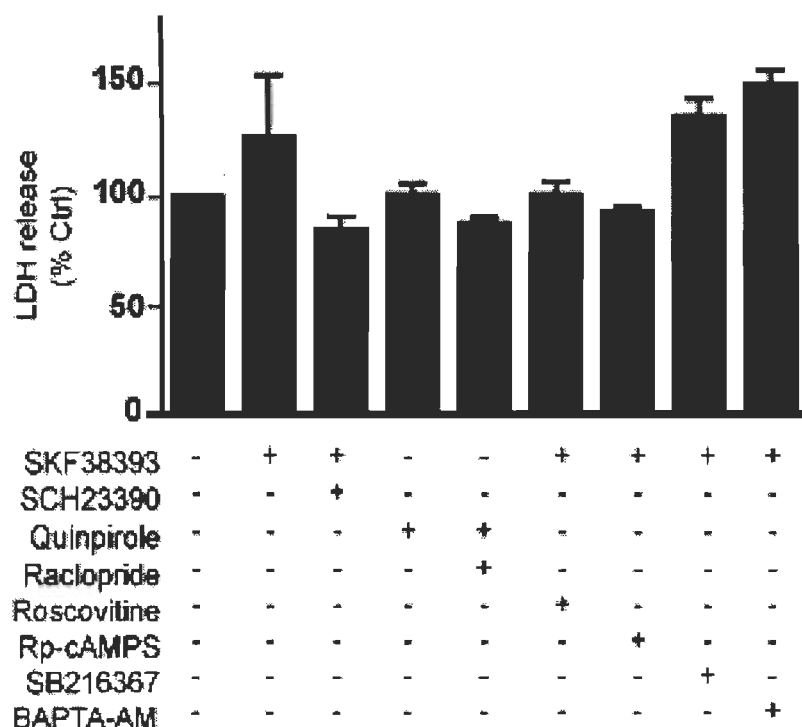


Figure 6.6 : Dopamine receptor stimulation is not associated with cellular death in rat striatal sections

LDH release assays were performed on rat striatal sections treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390, 10 μ M roscovitine, 100 μ M Rp-cAMPS, 10 μ M SB216367 or 100 μ M BAPTA-AM. Striatal sections were also treated with 10 μ M quinpirole alone or in combination with 500 nM raclopride. LDH release was normalized to the corresponding protein concentration. The data are expressed as mean percentages of control \pm S.E.M.; $n=2$ duplicate/treatment. Data were analyzed by 1-way ANOVA followed by the post hoc Newman–Keuls test $F_{8,36} = 2.7$ $P<0.02$

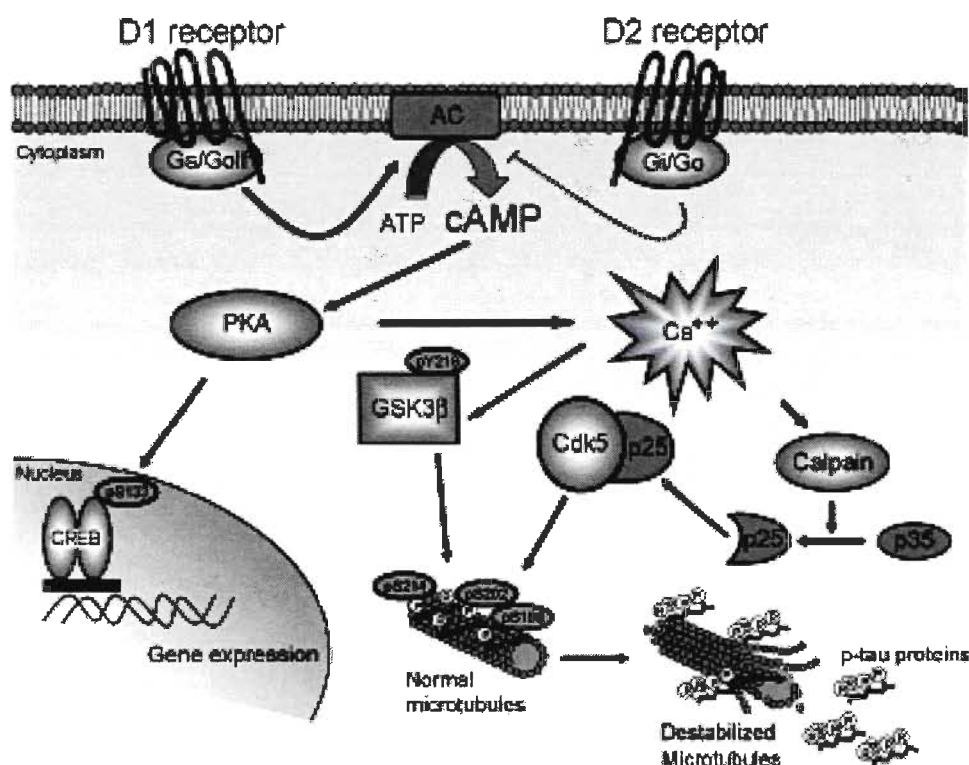


Figure 6.7 : After D1 receptor stimulation, tau is phosphorylated by activation of PKA, cdk5 and GSK3 β signaling pathways

The D1 class of receptors (D1 and D5 receptors) couple mostly to G_s/G_{olf} and stimulate production of the second messenger cAMP. After the increase in cAMP levels, PKA will be activated and will phosphorylate the transcription factor CREB which binds to definite DNA sequences and modulates the transcription of certain genes. In opposition, the D2 class of receptors (D2, D3 and D4 receptors) couple to G_i/G_o and negatively regulate cAMP production, which decreases general PKA activation. D1 receptor but not D2 receptor activation will phosphorylate tau. Through a PKA-dependent intracellular mechanism, D1 receptor activation will increase intracellular calcium levels, leading to both cdk5 activation by calpain proteolysis of p35, and GSK3 β activation through its phosphorylation at tyrosine 216. Tau hyperphosphorylation may impact neuronal synaptic plasticity as cytoskeletal constituents are involved in the maintenance of dendritic processes, and any changes in their stability could affect major cellular compartments, such as dendrites, spines and

synapses. Plain arrows represent activation or increased levels, whereas the broken arrow represents inhibition.

CHAPITRE 7

ÉVÈNEMENTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU MODULÉE PAR LES RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES D1 DANS LES CELLULES SK-N-MC

7.1 Molecular and Cellular Events of Dopamine D1 Receptor-Mediated Tau Phosphorylation in SK-N-MC cells

Manon Lebel and Michel Cyr

Groupe de recherche en Neurosciences, Département de chimie-biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boul. des Forges, C.P. 500,
Trois-Rivières (QC) G9A 5H7

7.2 Résumé

Les microtubules sont impliqués dans la formation d'axones et de dendrites, le maintien de la morphologie neuronale et le transport cellulaire. Des évidences récentes ont démontré que des médicaments affectant les niveaux de dopamine dans le cerveau induisaient des modifications du cytosquelette. Nous avons mis en évidence, dans des tranches de striatum de rats, une chaîne d'évènements moléculaires reliant l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 à la phosphorylation anormale de la protéine tau. Toutefois, les conséquences cellulaires de la phosphorylation de tau provoquée par les mécanismes intracellulaires induits suite à la stimulation des récepteurs D1 n'avaient pas été investigués. Dans ce papier nous démontrons, utilisant les cellules SK-N-MC exprimant de façon endogène des récepteurs D1 fonctionnels, que les niveaux de phosphorylation de la protéine tau sur les sérines 199-202 et la sérine 214 sont augmentés par l'utilisation d'agonistes dopaminergiques D1, induisant l'activation de mécanismes intracellulaires dépendants du calcium. De façon pharmacologique, nous démontrons que l'augmentation des niveaux intracellulaires de calcium mène à l'activation de Cdk5 via la protéolyse de p35 en p25 par la calpaïne ainsi qu'à l'activation GSK3 β par sa phosphorylation sur la tyrosine 216. Malgré le fait que l'activation de la PKA semble induire directement la phosphorylation de tau sur la sérine 214, elle ne semble pas impliquée dans la phosphorylation des sérines 199-202. Nous démontrons de plus que Cdk5 et GSK3 β , contrairement à la PKA, jouent un rôle central dans les dommages cellulaires induits par la stimulation des récepteurs D1. Nos résultats démontrent que l'activation de Cdk5 et GSK3 β via la stimulation des récepteurs D1 a une influence profonde sur les composantes du cytosquelette neuronal ainsi que dans la survie cellulaire des SK-N-MC.

7.3 Abstract

Microtubules are involved in the formation of axons and dendrites, maintenance of neuronal morphology and cellular trafficking. Recent studies suggest that drugs affecting dopamine activity in the brain can induce cytoskeletal modifications. For instance, we have demonstrated in acute rat brain slices a molecular chain of events connecting dopamine D1 receptor to aberrant phosphorylation of the microtubule-associated protein tau. However, the molecular and cellular effects of tau phosphorylated by means of the activation of dopamine receptors were unexplored. Here we used SK-N-MC cells, which express endogenously functional D1 receptors, to demonstrate that levels of phosphorylated tau at serines 199-202 or 214 are increased by a calcium-dependent pathway subsequent to D1 receptor stimulation. Using selective pharmacological tools, we showed that enhanced intracellular calcium lead to cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation, by calpain proteolysis of p35 to p25, as well as glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) activation, by its phosphorylation at tyrosine 216. Interestingly, while the activation of protein kinase A (PKA) led directly to the phosphorylation of tau at serine 214, tau phosphorylation at serines 199-202 was independent of PKA. In addition, inhibition cdk5 or GSK3 β prevented the decrease in cell viability induced by D1 receptor stimulation whereas PKA inhibition had no influence. Our data demonstrate that activation of cdk5 and GSK3 β following D1 receptor stimulation could have profound influence on both the neuronal cytoskeletal constituent tau and cell survival in SK-N-MC cells.

7.4 Introduction

The cytoskeletal polymer microtubules are component of cellular infrastructure that are required for fundamental biological processes ranging from cell division to brain functions. The regulation of microtubules' dynamic and function is directly dependent on microtubule-associated proteins element. In a mature brain neuron, one of the key microtubule-associated proteins that reside primarily in the axonal compartment is the tau protein. Tau is known to be involved in microtubule stabilization and polymerization (Shahani and Brandt, 2002) principally through the microtubule-binding domain. The function of tau is regulated by its phosphorylation state balanced by kinases and phosphatases activities (Johnson and Hartigan, 1999). Normally, tau binds directly to microtubules and promotes their polymerization. However, it is well established that increasing tau phosphorylation negatively regulates microtubules binding and leads to destabilization of the microtubules network, cytoskeletal dysfunctions and modification of synaptic plasticity (Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993; Drechsel et al., 1992; Pevalova et al., 2006; Plattner et al., 2006; Wang et al., 2007; Yoshida and Ihara, 1993). Hyperphosphorylated tau is the primary component of the fibrillary pathology in Alzheimer's disease (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2008). However, as tau-mediated neuronal death can occur in the absence of tangle formation (Jaworski et al., 2009; Le Corre et al., 2006; Morsch et al., 1999; Spires-Jones et al., 2008), understanding how abnormal phosphorylation of tau can induce toxicity becomes very important.

A link between aberrant systems of neurotransmission and enhanced phosphorylation of tau has been demonstrated in the rodent's brain (Cyr et al., 2003; Lebel et al., 2010; Meyer et al., 2008; Wang et al., 2007). For instance, it is documented that selective agonists of the adrenergic and dopamine receptors increase tau phosphorylation through protein kinase A (PKA) activation (Lebel et al., 2009; Zhang et al., 2006). However, whether other signalling pathways are associated with altered phosphorylation of tau and whether this hyperphosphorylation of tau subsequent to receptor activation results in a gain

of toxicity is still unknown. Recently, using acute rat brain slices, we have demonstrated that dopamine D1 receptors, but not the D2 receptors, induce hyperphosphorylation of tau directly via PKA activation or heightened levels of intracellular calcium leading to cdk5 and GSK3 activation (Lebel et al., 2009). The short term nature of these experiments does not allowed the investigation of the functional consequences of hyperphosphorylated tau. In fact, whether the hyperphosphorylation of tau subsequent to receptor activation results in a gain of toxicity is unknown in these conditions. Interestingly, selective D1 receptor activation has been associated with neurodegenerative processes in neuronal culture models (Chen et al., 2003; Lebel et al., 2007; Moussa et al., 2006). Dopamine mediated-NMDA receptors phosphorylation, activation of the ERK signaling pathway and increased levels of cdk5 are some of the mechanisms propose to be involved in D1 receptor mediated cellular dysfunction and neurodegeneration (Lebel et al., 2007). Our hypothesis is that alterations in the phosphorylation levels of tau might underlie the neuronal damage induced by D1 receptor activation reported in cell culture models.

In the present study, we use SK-N-MC cells to identify the molecular mechanism by which D1 receptor activation could lead to aberrant phosphorylation of tau and whether this impaired cellular integrity. SK-N-MC cells represent a suitable cellular model to study D1 receptor signalling pathways as with the exception of the endogenous expression of D1 receptors, there is no evidence of the expression of other functional dopamine receptors; the D1-like receptor D5 is not expressed in these cells (Sidhu et al., 1999). In contrast with our previous study in acute rat brain slices, our results in SK-N-MC cells demonstrate that hyperphosphorylation of tau at serine 199-202 is independent of PKA activation following D1 receptor stimulation. Moreover, the cellular damage induced by D1 receptor stimulation is prevented by either cdk5 or GSK3 inhibitors, suggesting a role of these kinases and phosphorylated tau on SK-N-MC cell viability. These data provide evidence of a direct association between activation of D1 receptor signalling constituents, tau hyperphosphorylation and cellular viability.

7.5 Materials and Methods

7.5.1 Materials and reagents

Human SK-N-MC neuroblastoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). RPMI 1640 medium (without phenol red, L-glutamine and sodium bicarbonate) was purchased from CellGro-Mediatech (Herndon, VA, USA). The D1 receptor agonist SKF38393 and the D1 receptor antagonist SCH23390 were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Calpeptin, roscovitine, and lithium chloride were acquired from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Rp-cAMPS, BAPTA-AM as well as phosphatase and protease inhibitor cocktails were from BioMol (Plymouth, PA, USA). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

7.5.2 Antibodies

Rabbit polyclonal antibody against tau phosphorylated at serine 214, rabbit polyclonal antibody against tau phosphorylated at serines 199-202, mouse monoclonal antibody against tau (tau 5), rabbit polyclonal p35 antibody (which also recognizes the p35-cleaved fragment p25), mouse monoclonal cdk5 antibody, rabbit polyclonal GAPDH antibody as well as a rabbit polyclonal antibody against GSK3 β phosphorylated at serine 9, GSK3 α phosphorylated at tyrosine 279 and GSK3 β phosphorylated at tyrosine 216 were purchased at Abcam (Cambridge, MA, USA). Goat anti-rabbit or goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody and SuperSignal chemiluminescent substrate kit were obtained from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

7.5.3 Cell culture and treatments

Human neuroblastoma SK-N-MC cells were grown in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics in a

humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂ at 37°C until 70-80% confluence. They were serum-starved for 12 hours with serum-free RPMI medium and treated with drugs for a period of 16 h.

7.5.4 Cell viability assay

Human neuroblastoma SK-N-MC cells were grown in 96-well culture plates in RPMI 1640 medium without phenol red supplemented with 10% Foetal bovine serum in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO₂ at 37°C until 60-70% confluent. Cells were then serum starved with serum-free RPMI medium and treated with drugs for a period of 16 h. 3 hours prior to the end of treatments, cells were incubated with 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (final concentration 0.5mg/ml) at 37°C and 5% CO₂ for 4 hours. The solubilization solution (10% SDS in 0.01 M HCl) is then added and the plates were incubates overnight. The solubilized formazan product is spectrophotometrically quantified using a microtiter plate reader (fluostar optima BMG LABTECH, Durham NC, USA) at 595 nm.

7.5.5 Western blot analysis

Cells extracts were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing Tris-HCl, NaCl, Triton x-100, sodium deoxycholate, protease and phosphatase inhibitor cocktails. Protein concentrations were determined by Bradford assays (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein (40 µg) were separated by SDS/10% PAGE, transferred on nitrocellulose membranes and immunoblotted overnight with selective primary antibodies. Primary antibody incubations were followed by several rinses in TBS/0.1% Tween 20 solution before incubation with secondary HRP-conjugated antibody. Protein bands were visualized by chemiluminescence reactions, and their immunoreactivity was quantitatively analyzed by Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA). The densitometry data were expressed as relative optical density.

7.5.6 Immunocytochemical analysis

After pharmacological treatment, the cells were rinsed and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. They were preincubated in a blocking solution (10% normal goat serum (NGS), 1.2% Triton X-100 in PBS) for 20 minutes at room temperature. The cells were then rinsed and incubated overnight at 4°C in a solution (2% NGS, 1.2% Triton-X-100) containing diluted polyclonal tau antibody, which recognizes protein phosphorylated at serine 214. After 2 washes in PBS, FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was added for 1 hour at room temperature. The cells were then counterstained with the DNA dye Hoechst-33342 (Molecular Probes) for 5 minutes at room temperature to evaluate nuclear integrity. Nuclei were considered apoptotic when they showed either condensed or fragmented chromatin. The cells were visualized under a IX70 Olympus inverted fluorescence microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA). Images were captured with the SPOT RT advanced digital camera system (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, USA) and Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

7.5.7 Statistical analysis

The data were presented as mean average \pm S.E.M. and analyzed by one-way or two-way ANOVA, followed by the post hoc Newman–Keuls test, using Graph Pad Prism version 5.0 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

7.6 Results

7.6.1 D1 receptor stimulation induced tau phosphorylation through cdk5 activation

We have previously documented the importance of PKA activation in the phosphorylation of tau at serine 214 after dopamine D1 receptor stimulation in

SK-N-MC cells (Lebel et al., 2009). However, whether D1 receptor activation was associated with the phosphorylation of other sites of tau was not determined in this cellular model. Western blot analyses were performed on proteins extracted from SK-N-MC cells treated 16 hours with 100 μ M of the D1 receptor agonist SKF38393. These time and doses were chosen based on previous published studies in which activation of PKA and CREB by SKF38393 were evaluated in SK-N-MC cells (Lebel et al., 2009; Moussa et al., 2006; Sidhu and Fishman, 1990). For instance, we demonstrated that 100 μ M SKF38393 treatment for 16 hours significantly induced phosphorylation of CREB at the PKA site serine 133 and was associated with 35% loss in cell viability. Using a selective antibody directed against tau phosphorylated at serines 199-202, we demonstrated that levels of phosphorylated tau at serines 199-202 were significantly increased (1.5 fold compare to control) following SKF38393 treatment (Fig. 7.1A). This effect was likely due to D1 receptor activation since it was completely prevented by a 30 minutes pre-treatment with the D1 receptor antagonist SCH23390 (Fig. 7.1A). Note that the levels of phosphorylated tau were unaffected by SCH 23390 alone (data not shown). To evaluate whether tau phosphorylation at serines 199-202 or serine 214 was PKA-dependent after D1 receptor stimulation, we treated cells with a specific PKA inhibitor, Rp-cAMPS (Dostmann et al., 1990; Eckstein, 1985), 30 minutes prior SKF38393 treatment. We observed that this inhibitor was able to prevent in totality the phosphorylation of tau at serine 214 whereas it had no significant effect at serines 199-202 (Fig. 7.1B). These data, in addition to confirm the importance of PKA activation in the phosphorylation of tau at serine 214 following D1 receptor stimulation, suggested that tau phosphorylation at serines 199-202 possibly occurred through a PKA independent mechanism.

Both *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that PKA, cdk5 and GSK3 are some of the most characterized kinases in the regulation of tau phosphorylation (Iqbal et al., 2005; Iqbal and Grundke-Iqbal, 2008; Shelton and Johnson, 2004; Spittaels et al., 2000). The role of cdk5 in the phosphorylation of tau at serines 199-202 and serine 214 was verified using roscovitine, a potent

cyclin dependant kinase inhibitor, 30 minutes prior SKF38393 treatment. We observed that roscovitine totally prevented tau phosphorylation (Fig. 7.1C). These results were further verified by immunofluorescence studies using an antibody raised against tau phosphorylated at serine 214. We confirmed that roscovitine prevented the emergence of phosphorylated tau after SKF38393 treatment (Fig. 7.1D). To visualize nuclear integrity, we counterstained D1 receptor agonist-treated cells with Hoechst-33342 and evaluated apoptotic body formation that is characteristic of apoptosis. Tau phosphorylation occurred mainly in healthy, non-apoptotic cells, as opposed to apoptotic cells showing condensed DNA (Fig. 7.1E).

These data suggested that cdk5 activity was increased subsequent to D1 receptor activation. In order to verify if this originated from increased cdk5 levels, we examined levels of cdk5 by Western blot technique. No effect on this protein's expression levels was observed after SKF38393 treatments alone or in combination with SCH23390 or roscovitine (Fig. 7.2A). Cdk5 required association with its primary activator p35 in order to be active (Tsai et al., 1994). During neurotoxicity, p35 is cleaved to a truncated form named p25, which is a more potent activator of cdk5 (Camins et al., 2006; Lee et al., 2000; Patzke and Tsai, 2002; Tsai et al., 2004). Association of cdk5 with p25 leads to hyperphosphorylation of tau in various cell lines and is known to disrupt the cytoskeletal network (Hung et al., 2005; Patrick et al., 1999; Plattner et al., 2006). We therefore assessed the possibility that an increased cdk5 activity was linked to the establishment of cdk5/p25 complexes. Using antibody that recognized p35 and p25, we observed that SKF38393 induced a robust increase in p25 levels and as a result, enhanced the p25/p35 ratio (1.5 fold) (Fig. 7.2B). Calpain is a calcium-dependent cysteine protease known to mediate the proteolysis of the cdk5 activator p35 in its truncated form p25 (Kusakawa et al., 2000; Lee et al., 2000; Nath et al., 2000). Interestingly, the calpain inhibitor calpeptin totally prevented the increased p25/p35 ratio subsequent to SKF38393 treatment. SCH23390 or calpeptin treatment alone did not modulate p25/p35 ratio (data not shown). Thereafter, the effects of calpeptin on the levels of

phosphorylated tau after SKF38393 treatments were evaluated. Western blot analysis revealed that calpeptin prevented the increased levels of tau phosphorylation at both serines 199-202 and 214 sites (Fig.7.2C). Note that calpeptin treatment alone has no effect on tau phosphorylation (data not shown). One factor leading to calpain activation and proteolysis of p35 is increased intracellular calcium levels (Lee et al., 2000). Pre-treatment with the intracellular calcium chelator BAPTA-AM prevented the increased p25/p35 ratio induced by SKF38393 (Fig. 7.2D). Moreover, BAPTA-AM completely prevented tau phosphorylation induced by SKF38393 at both serines 199-202 and 214 (Fig. 7.2E).

7.6.2 D1 receptor stimulation induced tau phosphorylation through GSK3 β activation

To assess whether GSK3 activity played a role in D1 receptor-induced tau phosphorylation, we used the GSK3 inhibitor lithium chloride (LiCl). While LiCl treatment alone did not affect phosphorylated tau levels (data not shown), it completely prevented the phosphorylation of tau following D1 receptor stimulation (Fig. 7.3A). The activity of GSK3 is known to be regulated by the phosphorylation of serine and tyrosine residues. Reduction in GSK3 β activity has been associated with phosphorylation of serine 9 and serine 21 whereas higher levels of activity were related to phosphorylation of tyrosine 216 (Jope and Johnson, 2004). We performed western blot analysis using antibodies directed against phosphorylated GSK3 β at serine 9 or tyrosine 216 in order to verify, respectively, levels of inactivated and activated forms of GSK3 β . Levels of total GSK3 β were not affected by treatments and our data were therefore expressed relative to these levels. SKF38393 treatment did not affect phosphorylated GSK3 β levels at serine 9 but enhanced significantly those at tyrosine 216 (Fig. 7.3B). This process was induced in part by D1 receptor stimulation as it was partly prevented by a pre-treatment with SCH23390. Levels of GSK3 α were also verified following D1 receptor stimulation but no significant effect was observed (data not shown). Levels of intracellular calcium

have been recognized to influence the activity of GSK3 (Hartigan and Johnson, 1999). To determine whether GSK3 β activation subsequent to D1 receptor agonist treatment was due to increased intracellular calcium levels, we pre-treated cells with BAPTA AM before the SKF38393 treatment. This pre-treatment totally prevented GSK3 β phosphorylation at tyrosine 216 (Fig. 7.3C).

7.6.3 D1 receptor stimulation affected SK-N-MC cells survival through cdk5 and GSK3 activities

D1 receptors stimulation has been described previously to impaired SK-N-MC cell viability (Chen et al., 2004; Chen et al., 2003; Moussa et al., 2006; Robinson et al., 2008). To confirm this observation, we performed MTT test on SK-N-MC cells treated 16 hours with 100 μ M SKF38393. We demonstrated that cell viability was significantly (~30%) reduced after D1 receptor stimulation (Fig. 7.4). Remarkably, pre-treatment with roscovitine or LiCl prevented the impaired cellular viability subsequent to D1 receptors activation whereas Rp-cAMPS had no effect. These results suggested that cdk5 and GSK3 activity, but not PKA, played a significant role in the cellular damage associated with D1 receptor activation.

7.7 Discussion

Here we demonstrate that stimulation of D1 receptors in SK-N-MC cells increases tau phosphorylation and impaired cell viability via the activation of GSK3 β and cdk5. SK-N-MC cell is a cellular model that endogenously expressed the D1 dopamine receptor and there is no evidence that other dopamine receptors are functional; the D1-like receptor D5 is not expressed in these cells (Sidhu et al., 1999). This distinctiveness of SK-N-MC cells, paired with the fact that D1 receptor antagonist prevents the effects of D1 receptor agonist, suggests that D1 receptor activation is directly responsible for tau phosphorylation and cellular damage. This finding confirms and extends our previous work on acute rat striatal slice preparations (Lebel et al., 2009). In this

study, we demonstrate that D1 receptor agonist transiently phosphorylates tau in a time-dependent manner, whereas D2 receptor agonist has no effect. In these experiments, it was impossible to demonstrate the direct link between D1 receptor and tau phosphorylation as this effect could have been due, indirectly, to the release of other neurotransmitters such as glutamate, also present in the striatum (Wu et al., 2006). Therefore, these previous data on rats' striatal sections paired with the present finding that D1 receptor agonist also induces tau phosphorylation in SK-N-MC cells put forward a direct contribution of D1 receptors.

Our findings suggest novel molecular pathways of D1 receptor activation leading to impaired cell viability in SK-N-MC cells. We demonstrate that stimulation of D1 receptor is associated with increased intracellular calcium that will activate cdk5, throughout activation of calpain and enhanced proteolytic cleavage of p35 to p25, and GSK3 β , throughout its phosphorylation at tyrosine 216, which will in turn phosphorylate tau. These data are in accord with previous study demonstrating that serine 214, and especially 199-202 residues of tau protein, are phosphorylated by the activation of cdk5 and GSK3 (Hanger et al., 2009; Lebel et al., 2009). Cdk5 and GSK3 β are kinases recognized to mediate the phosphorylation of tau at disease-associated sites and neuronal loss (Baumann et al., 1993; Paudel et al., 1993; Smith et al., 2006). This is an interesting issue as dopamine, through D1 receptor activation, has been reported to impair SK-N-MC cells survival. This effect of dopamine on cell survival appears to be neuronal specific, as demonstrated by its inability of triggering apoptosis in A549 lung carcinoma cells and Cos-7 kidney fibroblasts (Chan et al., 2007). However, the molecular mechanisms by which the D1 receptor exerts this cellular effect are not fully understood. It is proposed that dopamine-induced SK-N-MC cells damage was unlikely to be directly proportional to their corresponding cAMP levels, suggesting involvement of other signalling molecules in this process. For instance, there is divergent evidence that ERK or JNK pathways might be activated subsequently to D1 receptor stimulation. (Chan et al., 2007; Chen et al., 2004; Chen and Sidhu, 2005). The link between

tau phosphorylation and PKA-independent cellular death in SK-N-MC cells will definitively requires further experiments in order to completely understand and integrate these pathways.

Another interesting result is that D1 receptor agonist decreased cell viability in association with increased levels of phosphorylated tau at serines 214 and 199-202. It is known that phosphorylation of tau at serine 214, and especially 199-202 residues, reduces its ability to bind to microtubules and is typically associated with toxic accumulation of hyperphosphorylated tau (Steinhilb et al., 2007; Tian et al., 2009). Our immunofluorescence study reveals that phosphorylated tau does not display an aggregated phenotype and could be located in healthy cells (no sign of condensed DNA). Moreover, the phosphorylated tau proteins accumulate in SK-N-MC cells through a heterogeneous manner after D1 receptor activation. We believe that this phenomenon could be explained in part by the intrinsic nature of these mitotic cells that are not entirely at the same division phase at the same time. It is thus expected that the D1 receptors expression levels will vary from cell to cell. On the other hand, this finding is consistent with the idea that hyperphosphorylated tau might induced cytoskeletal disruptions which will in turn affect cell division and survival (Alonso et al., 2008; Lopes et al., 2009). Interestingly, our previous *in vivo* studies also suggest that hyperphosphorylated tau, while clearly accumulating in the cytoplasm of cells, causes rather subtle cellular effects. For instance, we have demonstrated in mice with persistently-elevated extracellular dopamine, resulting from inactivation of the dopamine transporter gene, that the hyperphosphorylation of tau is reversible and is not associated with the formation of insoluble aggregates (Cyr et al., 2003). However, hyperphosphorylated tau is still tightly associated with striatal dysfunction and motor impairment in these mice (Cyr et al., 2003; Cyr et al., 2005). More recently, we demonstrate that chronic L-DOPA treatment is associated with a hyperphosphorylation of tau in the striatum of 6-hydroxydopamine lesioned rat model of Parkinson's disease (Lebel et al., 2010). Enhanced phosphorylated tau levels are observed in parallel with the emergence of dyskinesia in these

animals. Altogether, these findings underscore the importance of tau in stabilization of the microtubule network and modification of neuronal activity. Moreover, we demonstrate a direct link between activation of D1 receptor, enhanced cdk5 and GSK3 activities, abnormal phosphorylation of tau and impaired SK-N-MC viability.

Acknowledgment

We thank Geneviève Bureau for helpful discussions. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant 311763-07) and the Canada Research Chair in Molecular Neuropharmacology.

7.8 References

- Alonso AC, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2008. Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer research* 5(4):375-384.
- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E. 1993. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336(3):417-424.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11(1):153-163.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. 1993. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10(6):1089-1099.
- Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas AM, Pallas M. 2006. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect* 19(8):453-460.
- Chan AS, Ng LW, Poon LS, Chan WW, Wong YH. 2007. Dopaminergic and adrenergic toxicities on SK-N-MC human neuroblastoma cells are mediated through G protein signaling and oxidative stress. *Apoptosis* 12(1):167-179.
- Chen J, Rusnak M, Luedtke RR, Sidhu A. 2004. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *The Journal of biological chemistry* 279(38):39317-39330.
- Chen J, Sidhu A. 2005. The role of D1 dopamine receptors and phospho-ERK in mediating cytotoxicity. *Commentary. Neurotox Res* 7(3):179-181.
- Chen J, Wersinger C, Sidhu A. 2003. Chronic stimulation of D1 dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastoma cells induces nitric-oxide synthase activation and cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 278(30):28089-28100.
- Cyr M, Beaulieu JM, Laakso A, Sotnikova TD, Yao WD, Bohn LM, Gainetdinov RR, Caron MG. 2003. Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19):11035-11040.

Cyr M, Caron MG, Johnson GA, Laakso A. 2005. Magnetic resonance imaging at microscopic resolution reveals subtle morphological changes in a mouse model of dopaminergic hyperfunction. *Neuroimage* 26(1):83-90.

Dostmann WR, Taylor SS, Genieser HG, Jastorff B, Doskeland SO, Ogreid D. 1990. Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinases I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. *The Journal of biological chemistry* 265(18):10484-10491.

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3(10):1141-1154.

Eckstein F. 1985. Nucleoside phosphorothioates. *Annu Rev Biochem* 54:367-402.

Hanger DP, Anderton BH, Noble W. 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in molecular medicine* 15(3):112-119.

Hartigan JA, Johnson GV. 1999. Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 β -dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 274(30):21395-21401.

Hung KS, Hwang SL, Liang CL, Chen YJ, Lee TH, Liu JK, Howng SL, Wang CH. 2005. Calpain inhibitor inhibits p35-p25-Cdk5 activation, decreases tau hyperphosphorylation, and improves neurological function after spinal cord hemisection in rats. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64(1):15-26.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 1739(2-3):198-210.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2008. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* 12(1):38-55.

Jaworski T, Dewachter I, Lechat B, Croes S, Termont A, Demedts D, Borghgraef P, Devijver H, Filipkowski RK, Kaczmarek L, Kugler S, Van Leuven F. 2009. AAV-tau mediates pyramidal neurodegeneration by cell-cycle re-entry without neurofibrillary tangle formation in wild-type mice. *PLoS one* 4(10):e7280.

Johnson GV, Hartigan JA. 1999. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J Alzheimers Dis* 1(4-5):329-351.

Jope RS, Johnson GV. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29(2):95-102.

Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. 2000. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *The Journal of biological chemistry* 275(22):17166-17172.

Le Corre S, Klafki HW, Plesnila N, Hubinger G, Obermeier A, Sahagun H, Monse B, Seneci P, Lewis J, Eriksen J, Zehr C, Yue M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Roder HM. 2006. An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(25):9673-9678.

Lebel M, Chagniel L, Bureau G, Cyr M. 2010. Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiology of disease* 38(1):59-67.

Lebel M, Patenaude C, Allyson J, Massicotte G, Cyr M. 2009. Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways. *Neuropharmacology* 57(4):392-402.

Lebel M, Robinson P, Cyr M. 2007. Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci* 34(1):18-29.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. 2000. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405(6784):360-364.

Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. 2009. Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? *Current Alzheimer research* 6(3):205-212.

Meyer DA, Richer E, Benkovic SA, Hayashi K, Kansy JW, Hale CF, Moy LY, Kim Y, O'Callaghan JP, Tsai LH, Greengard P, Nairn AC, Cowan CW, Miller DB, Antich P, Bibb JA. 2008. Striatal dysregulation of Cdk5 alters locomotor responses to cocaine, motor learning, and dendritic morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(47):18561-18566.

Morsch R, Simon W, Coleman PD. 1999. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58(2):188-197.

Moussa CE, Tomita Y, Sidhu A. 2006. Dopamine D1 receptor-mediated toxicity in human SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 48(3):226-234.

- Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP, Wang KK. 2000. Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274(1):16-21.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402(6762):615-622.
- Patzke H, Tsai LH. 2002. Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *The Journal of biological chemistry* 277(10):8054-8060.
- Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH. 1993. Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* 268(31):23512-23518.
- Pevalova M, Filipcik P, Novak M, Avila J, Iqbal K. 2006. Post-translational modifications of tau protein. *Bratisl Lek Listy* 107(9-10):346-353.
- Plattner F, Angelo M, Giese KP. 2006. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 281(35):25457-25465.
- Robinson P, Lebel M, Cyr M. 2008. Dopamine D1 receptor-mediated aggregation of N-terminal fragments of mutant huntingtin and cell death in a neuroblastoma cell line. *Neuroscience* 153(3):762-772.
- Shahani N, Brandt R. 2002. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 59(10):1668-1680.
- Shelton SB, Johnson GV. 2004. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 88(6):1313-1326.
- Sidhu A, Fishman PH. 1990. Identification and characterization of functional D1 dopamine receptors in a human neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 166(2):574-579.
- Sidhu A, Olde B, Humblot N, Kimura K, Gardner N. 1999. Regulation of human D1 dopamine receptor function and gene expression in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuroscience* 91(2):537-547.
- Smith PD, Mount MP, Shree R, Callaghan S, Slack RS, Anisman H, Vincent I, Wang X, Mao Z, Park DS. 2006. Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci* 26(2):440-447.

Spire-Jones TL, de Calignon A, Matsui T, Zehr C, Pitstick R, Wu HY, Osetek JD, Jones PB, Bacskai BJ, Feany MB, Carlson GA, Ashe KH, Lewis J, Hyman BT. 2008. In vivo imaging reveals dissociation between caspase activation and acute neuronal death in tangle-bearing neurons. *J Neurosci* 28(4):862-867.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R, Van Leuven F. 2000. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 275(52):41340-41349.

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB. 2007. S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *Journal of neuroscience research* 85(6):1271-1278.

Tian Q, Zhang JX, Zhang Y, Wu F, Tang Q, Wang C, Shi ZY, Zhang JH, Liu S, Wang Y, Zhang Q, Wang JZ. 2009. Biphasic effects of forskolin on tau phosphorylation and spatial memory in rats. *J Alzheimers Dis* 17(3):631-642.

Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Jr., Chae T, Harlow E. 1994. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371(6496):419-423.

Tsai LH, Lee MS, Cruz J. 2004. Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochimica et biophysica acta* 1697(1-2):137-142.

Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25(1):59-68.

Wu J, Dougherty JJ, Nichols RA. 2006. Dopamine receptor regulation of Ca²⁺ levels in individual isolated nerve terminals from rat striatum: comparison of presynaptic D1-like and D2-like receptors. *Journal of neurochemistry* 98(2):481-494.

Yoshida H, Ihara Y. 1993. Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *Journal of neurochemistry* 61(3):1183-1186.

Zhang Y, Li HL, Wang DL, Liu SJ, Wang JZ. 2006. A transitory activation of protein kinase-A induces a sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites in N2a cells-implicates a new mechanism in Alzheimer pathology. *J Neural Transm* 113(10):1487-1497.

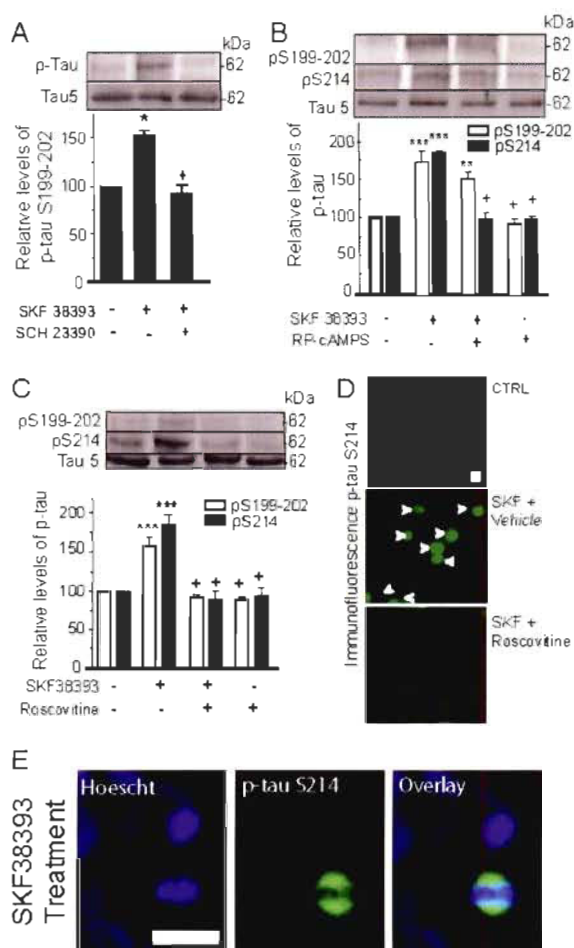


Figure 7.1: Tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation occurred through a cdk5-dependent mechanism.

Protein levels were evaluated by Western blotting on SK-N-MC cells extracts (40 μ g proteins). (A) Phosphorylated tau levels at serine 199-202, expressed relative to total tau (Tau5) levels, were measured in cells treated 16 h with 100 μ M of SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of SCH23390. (B) Phosphorylated tau levels at serines 199-202 and 214 were measured in cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 100 μ M of the PKA inhibitor Rp-cAMPS. The data are expressed relative to total tau levels. (C) Phosphorylated tau levels at serines 199-202 and 214 were measured in cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the cdk5

inhibitor roscovitine. The data are expressed relative to total tau levels. Western blot data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of respective control values) \pm S.E.M., $n=4$ quadruplicate/treatment. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ vs respective control and + $p<0.001$ vs respective SKF38393 treatment alone. Statistical analysis was performed by one-way [A] or two-way [B and C] ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test. (D) Representative examples of immunofluorescence images of study on SK-N-MC cells treated with 100 μ M SKF38393 or a combination of 100 μ M SKF38393 and 10 μ M roscovitine, using antibody against tau phosphorylated at serine 214. (E) Examples of double immunofluorescence study with antibodies raised against tau phosphorylated at serine 214 (green) and the DNA marker Hoechst 33342 (blue) in SK-N-MC cells treated with 100 μ M SKF38393 for 16 hours. Arrows show SK-N-MC cells positive for phosphorylated tau at serine 214. The scale bar represents 20 μ m.

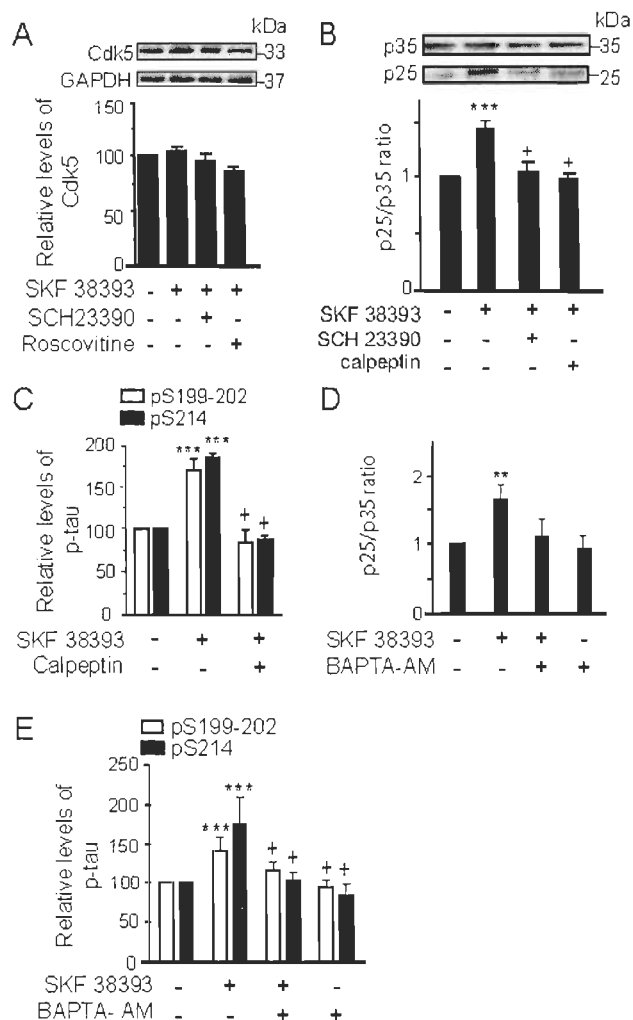


Figure 7.2 : Inhibition of the p35 proteolysis by the calcium dependent protease calpain prevents tau phosphorylation induced by D1 receptor stimulation.

Protein levels were evaluated by Western blotting on SK-N-MC cells extracts (40 μ g proteins). (A) Levels of cdk5 were assessed on cells treated with 100 μ M of the D1 receptor agonist SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the D1 receptor antagonist SCH23390 or 10 μ M of the cdk5 inhibitor roscovitine. These data are expressed relative to GAPDH levels. (B) The p25/p35 ratio was determined on cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390 or 10 μ M of the calpain inhibitor calpeptin. These data are

expressed relative to GAPDH levels (C) Levels of phosphorylated tau at serine 199-202 and 214 were assessed on cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the calpain inhibitor calpeptin. These data are expressed relative to total tau levels. (D) The p25/p35 ratio and (E) levels of phosphorylated tau at serines 199-202 and 214 were evaluated on cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the intracellular calcium chelator BAPTA-AM. Data are expressed relative to GAPDH and total tau levels, respectively. The data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of respective control values) \pm S.E.M., n=3 triplicate/treatment. ***p<0.001, **p<0.01 vs the respective controls and [†]p<0.001 vs respective SKF38393 treatment alone. Statistical analysis was performed by one-way [A, B and D] or two-way [C and E] ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

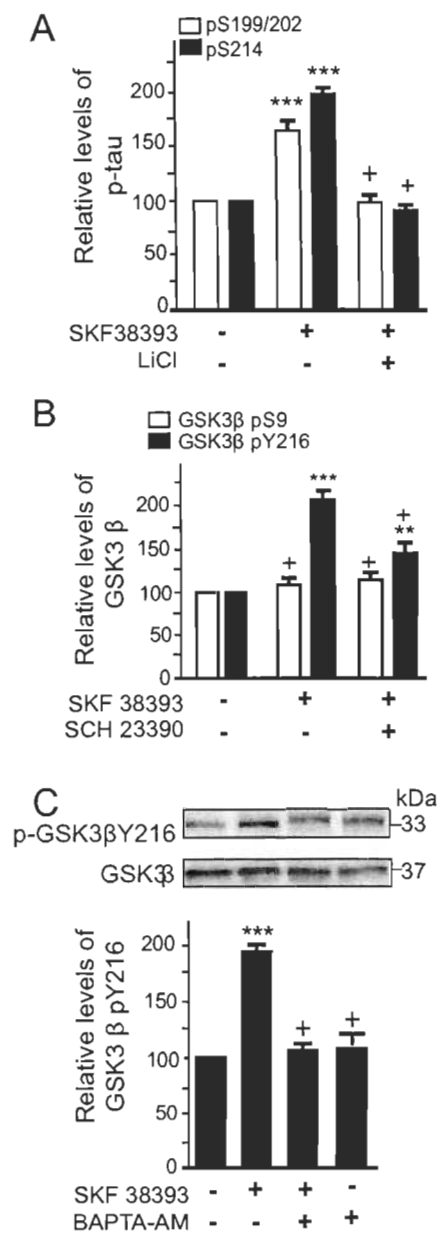


Figure 7.3: A role for GSK3 in the phosphorylation of tau induced by D1 receptor stimulation.

Protein levels were evaluated by Western blotting on SK-N-MC cells extracts (40 μ g proteins). (A) Phosphorylated tau levels at serines 199-202 and serine 214 were assessed on cells treated with 100 μ M of the D1 receptor agonist SKF38393 alone or in combination with 100 mM of the GSK3 inhibitor LiCl. The

data are expressed relative to total tau levels. (B) Phosphorylated GSK3 β levels at serine 9 and tyrosine 216 were evaluated on cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390. The data are expressed relative to total GSK3 β levels. (C) Phosphorylated GSK3 β levels at tyrosine 216 were evaluated on cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M of the intracellular calcium chelator BAPTA-AM. The data are expressed relative to total GSK3 β levels. Data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of respective control values) \pm S.E.M., n=3 triplicate/treatment. ***p<0.001 and ** p<0.01 vs respective control values and *p<0.001 vs respective SKF38393 treatment alone. Statistical analysis was performed by one-way [C] or two-way [A and B] ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

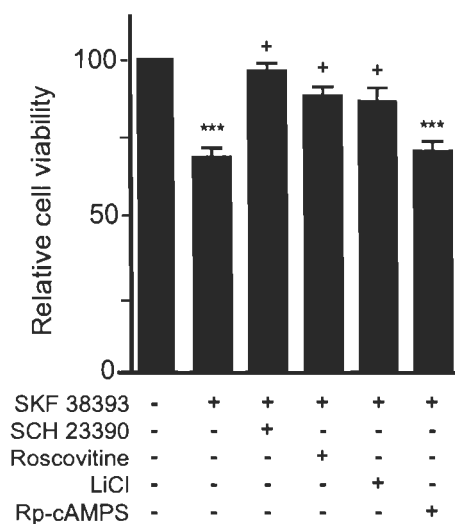


Figure 7.4: Inhibition of cdk5 and GSK3 activity, but not PKA, prevented cellular death induced by D1 dopamine receptor stimulation in SK-N-MC cells.

Cell viability assay (MTT) were performed on SK-N-MC cells treated with 100 μ M SKF38393 alone or in combination with 10 μ M SCH23390, 10 μ M roscovitine, 100mM LiCl or 100 μ M Rp-cAMPS. The data are expressed as mean percentages of respective control \pm S.E.M., n=3 triplicate/treatment. ***p<0.001 vs the respective control value and +p<0.001 vs respective SKF38393 treatment alone. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

CHAPITRE 8

RÔLE DE LA PKA ET DES PROTÉINES DU CYTOSQUELETTE DANS LA MALADIE DE PARKINSON ET LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA

8.1 Striatal inhibition of protein kinase A prevents levodopa-induced neurochemical changes and abnormal involuntary movements in the hemiparkinsonian rat model

Manon Lebel, Laure Chagniel, Geneviève Bureau and Michel Cyr

Groupe de recherche en neurosciences, Département de chimie-biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boul. des Forges, C.P. 500,
Trois-Rivières (QC) G9A 5H7

8.2 Résumé

La L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) est le médicament de choix utilisé pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. Toutefois, un traitement à long terme avec ce médicament est associé à l'apparition de mouvements anormaux involontaires connus sous le nom de dyskinésies. Les changements moléculaires sous jacents à ces complications motrices ne sont pas encore totalement élucidés. En utilisant un modèle de rat hémiparkinsonien, obtenu suite à l'injection unilatérale de 6-hydroxydopamine, nous avons démontré que la L-DOPA induit des modifications importantes dans l'activité de trois marqueurs moléculaires connus des dyskinésies soit Δ FosB, DARPP-32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein 32kDa) et ERK1 / 2 (extra-cellular signal regulated kinase) ainsi que dans les niveaux de phosphorylation de la protéine tau associée aux microtubules. Ces modifications sont attribuables à l'activation de la protéine kinase A (PKA) et à la stimulation intermittente des récepteurs dopaminergiques car ils sont totalement prévenus par l'infusion intrastriale de Rp-cAMPS, un inhibiteur sélectif de la PKA, ou par l'administration continue de la L-DOPA via une mini-pompe osmotique sous-cutanée. L'administration en mode continu de la L-DOPA n'induit aucune complication motrice et l'inhibition intrastriale de la PKA atténue de façon significative l'émergence des mouvements anormaux involontaires chez le rat hémiparkinsonien. Nos résultats démontrent également qu'aucun de nos traitements n'affecte l'effet positif de la L-DOPA sur les déficits locomoteurs. Malgré le fait que l'inhibition de la PKA dans le striatum puisse représenter un défi clinique de taille, ces résultats apportent de nouvelles évidences que l'activation de la PKA, par le biais de modifications de la signalisation striatale et des changements importants dans les constituants du cytosquelette des neurones, joue un rôle clé dans l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA.

8.3 Abstract

L-3,4-dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride (L-DOPA) is the gold standard for symptomatic treatment of Parkinson's disease (PD), but long-term therapy is associated with the emergence of abnormal involuntary movements (AIMS) known as L-DOPA-induced dyskinesias (LID). The molecular changes underlying LID are not completely understood. Using the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of PD, we showed that L-DOPA elicits profound alterations in the activity of 3 LID molecular markers, namely Δ FosB, DARPP-32 and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), as well as in phosphorylation levels of the cytoskeletal-associated protein tau. These modifications are triggered by protein kinase A (PKA) activation and intermittent stimulation of dopamine receptors as they are totally prevented by intrastriatal injections of Rp-cAMPS, a PKA inhibitor, or by continuous administration of L-DOPA via subcutaneous mini-pump. Importantly, Rp-cAMPS does not modulate the positive effect of L-DOPA on locomotor deficits and significantly attenuates the emergence of AIMS in 6-hydroxydopamine hydrobromide-lesioned rats. Even if decreased PKA signalling in the striatum may represent a clinical challenge, these data provide novel evidence that PKA activation, through modification of striatal signalling and alterations of cytoskeletal constituents, plays a key role in the manifestation of LID.

Keywords: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, L-DOPA, Dyskinesia, Dopamine, Caudate-Putamen, Protein kinase A, Rp-cAMPS, Tau, Stathmin

8.4 Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta with subsequent loss of dopaminergic input to the striatum. Treatment strategies, consisting of dopamine replacement and L-3,4-dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride (L-DOPA), are still the most effective and commonly used in PD. With disease progression, the therapeutic window for L-DOPA narrows, and doses that reduce Parkinsonism also evoke abnormal involuntary movements (AIMS) known as L-DOPA-induced dyskinesias (LID) (Nutt et al., 2000; Ahlskog and Muenter, 2001). The majority of PD patients under L-DOPA therapy develop motor complications within 5-10 years of treatment (Rascol et al., 2000; Bezard et al., 2001). These complications impair fine motor control and constitute a challenge in the management of PD (Obeso et al., 2000). The pathogenesis of LID is not completely understood. Animal models have demonstrated that LID are paralleled by increased signal transduction and significant changes in striatal protein expression (Doucet et al., 1996; Brotchie et al., 1998; Cenci, 2002; Gerfen et al., 2002; Aubert et al., 2005). Basically, the most recognized molecular markers of LID are elevation of Δ FosB, phosphorylation of DARPP-32 at threonine34 and activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) (Andersson et al., 1999; Cenci, 2002; Gerfen et al., 2002; Winkler et al., 2002; Picconi et al., 2003; Pavon et al., 2006; Santini et al., 2007; Westin et al., 2007). Interestingly, each of these signalling molecules can be physiologically activated by protein kinase A (PKA). However, the link between PKA activity, these molecular marker expression levels and the emergence of LID is unknown. We recently uncovered a novel molecular chain of events connecting PKA activation, through D1 dopamine receptor stimulation, and abnormal phosphorylation of the cytoskeletal-associated protein tau (Lebel et al., 2009). These data are interesting in that abnormal tau phosphorylation negatively regulates microtubule-binding and leads to destabilization of the microtubule network, cytoskeletal dysfunction and modification of synaptic

plasticity (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006; Mazanetz and Fischer, 2007). Whether tau is another player in the molecular reorganization associated with LID is still not clear.

In the present study, we focused on a widely-known rat model of AIMS to investigate the role of PKA in striatal molecular reorganization and the emergence of motor complications in conjunction with the pulsatile administration of L-DOPA. In parallel, we evaluated whether continuous delivery of L-DOPA, by subcutaneous mini-pump in 6-hydroxydopamine hydrobromide (6-OHDA)-lesioned rats, affects the occurrence of AIMS. We demonstrated that the latter mode of L-DOPA delivery is not linked with either the apparition of AIMS or changes in striatal protein expression in response to intermittent dopamine receptor stimulation. Interestingly, intrastriatal inhibition of PKA entirely prevents increased levels of Δ FosB and phosphorylated ERK1/2 and DARPP-32 levels at threonine34 induced by pulsatile L-DOPA treatment. While tau phosphorylation levels were not affected by 6-OHDA lesion, they increased with pulsatile L-DOPA treatment in association with AIMS, and intrastriatal inhibition of PKA was able to prevent this phenomenon. Thus, inhibition of PKA remarkably restrains the expression and activation of these signalling molecules that are associated with the emergence of AIMS. Importantly, however, PKA inhibition only partially prevents AIMS evoked by L-DOPA in this rat model of Parkinsonism. We provide the first evidence that PKA inhibition, through modifications in the intracellular signalling of striatal neurons, plays a central part in the advent of motor complications deriving from chronically-administered L-DOPA.

8.5 Materials and methods

8.5.1 Chemical reagents

Male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). 6-OHDA, desipramine hydrochloride, L-DOPA,

benserazide hydrochloride and R(-) apomorphine hydrochloride hemihydrate were procured from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Osmotic mini-pump (Models 2ML4 and 2004) and brain infusion kit 2 were purchased from ALZET (Cupertino, CA, USA). Rp-cAMPS was from BioMol (Plymouth, PA, USA). Phosphatase and protease inhibitor cocktails were sourced from Roche (Indianapolis, IN, USA). All other chemicals came from Sigma-Aldrich.

8.5.2 Antibodies

Rabbit polyclonal DARPP-32 (phospho-threonine34) antibody against DARPP-32 phosphorylated at threonine34, rabbit polyclonal DARPP-32 antibody against total DARPP-32, rabbit polyclonal antibody phospho-serine214 against tau phosphorylated at serine214, mouse monoclonal antibody against total tau (tau 5), rabbit polyclonal tyrosine hydroxylase (TH) antibody and rabbit polyclonal GAPDH antibody were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). Mouse monoclonal anti-NeuN antibody was purchased from Chemicon. Goat polyclonal p-Op18 (serine16) antibody raised against Op18 (stathmin) phosphorylated at serine16, mouse monoclonal Op18 antibody against total Op18 and rabbit polyclonal Δ FosB antibody came from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit polyclonal phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) antibody against ERK1/2 phosphorylated at threonine202/tyrosine204 of ERK1 and threonine185/tyrosine187 of ERK2 and rabbit polyclonal p44/42 MAPK (ERK1/2) antibody against total ERK1/2 were acquired from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Goat anti-rabbit and goat anti-mouse peroxidase conjugated antibody as well as SuperSignal chemiluminescent substrate kit were from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA). Fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse and Texas red-conjugated anti-rabbit secondary antibodies were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Hoechst 33342 was bought from Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

8.5.3 Animals and 6-OHDA lesions

Adult male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were housed in pairs in a climate-controlled room (14-h light/10-h dark cycle) with food and water available *ad libitum*. All experiments, approved by the institutional animal care committee, were in accordance with ethical standards of the Canadian Council on Animal Care. Under isoflurane anaesthesia, the rats were injected unilaterally in the medial forebrain bundle (MFB) (antero-posterior (AP): -4.3 mm, and medial-lateral (ML): 1.7 mm from the bregma; dorso-ventral (DV): 8.2 mm from the dura (Paxinos and Watson, 2007) with either vehicle (sham) or 6-OHDA (2.5 μ l, 5 mg/ml free base in 0.1% ascorbic acid) at a rate of 0.5 μ l/min. Thirty min prior to intracranial injection, they received subcutaneous (s.c.) injection of desipramine (15 mg/kg) to protect noradrenergic neurons. Non-injected rats were also studied. The experimental design is given in Figure 1. After a 10-day recovery period, the extent of denervation was tested by measuring, for 30 min, turns contralateral to the lesion after apomorphine (1 mg/kg, s.c.) challenge. Only rats showing pronounced rotational behaviour were selected (≥ 5 contralateral turns/min). It has been demonstrated that rats manifesting this circling behaviour display more than 90% depletion of striatal dopamine (Papa et al., 1994; Schwarting and Huston, 1996).

8.5.4 Rp-cAMPS intrastriatal infusion

Three days before vehicle and intermittent L-DOPA treatments, 6-OHDA-lesioned rats were anaesthetized under isoflurane and placed in a stereotaxic frame. A cannula was placed in the anterior striatum at the following stereotaxic coordinates: AP: 0.8 mm and ML: 1.90 mm from the bregma; DV: 4.8 mm from the dura (Paxinos and Watson, 2007). It was kept in place with Loctite instant adhesive. An ALZET mini-pump (Model 2004, 0.25 μ l/h, 28 days) was placed surgically s.c. between scapulae and connected to the cannula. The rats received continuous intrastriatal infusion of either saline or Rp-cAMPS (40 nmol/day) until the end of the experiment (24 days). We selected the dose

of 40 nmol/day based on a previous study using intrastriatal injections of Rp-cAMPS in the rat nucleus accumbens (Misra and Pandey, 2006).

8.5.5 L-DOPA treatments

Four weeks after 6-OHDA lesions, rats were given s.c. injections of either vehicle or L-DOPA (25 mg/kg) combined with benserazide (12.5 mg/kg) twice a day for 21 consecutive days. One group of 6-OHDA-lesioned rats was anaesthetized under isoflurane for s.c. implantation of ALZET osmotic minipumps (Model 2ML1, 10 μ l/h, 1 week). These animals received either saline or L-DOPA (25 mg/kg) combined with benserazide (12.5 mg/kg) continuously for 21 days. The pumps were changed every week.

8.5.6 Rotarod test

Accelerating rotarod experiments were performed to assess the effects of pharmacological treatment on rat motor performance and coordination. Briefly, the animals were pre-trained on the rotarod apparatus (AccuScan Instruments Inc., OH, USA) to reach stable performance in the test. Training consisted of 10 sessions on 3 consecutive days where the rats were placed on rods that accelerated gradually from 4 to 40 rotations per min (rpm) over 300s. Subsequently, they received vehicle or 6-OHDA injection in the right MFB. On the previous day before apomorphine challenge, the animals were tested in 3 sessions on the rotarod to evaluate the effect of vehicle and 6-OHDA on their motor performance. In the L-DOPA experiments, the animals submitted to 3 sessions on the rotarod on days 10 and 20. In the pulsatile L-DOPA experiments, they were tested 2 h post-drug administration. Intact animals were also tested in all time points.

8.5.7 Analysis of AIMS

AIMS were scored on days 0, 7, 14 and 21 of L-DOPA treatment, according to a rat dyskinesia scale (Winkler et al., 2002). The rats were placed individually in transparent plastic cages and scored every 20 min, for a period of 1 min, throughout 180 min after a single dose of either saline or L-DOPA. Those receiving continuous saline or L-DOPA infusion were also scored. AIMS subtypes were classified as forelimb, orolingual, axial and locomotive. Enhanced manifestations of normal behaviours, such as grooming, sniffing and gnawing, were not included in the rating. AIMS severity was assessed on a scale from 0 to 4 for each of the 4 subtypes: 0 was accorded for the absence of AIMS; 1 for occasional (<50% of observation time); 2 for frequent (>50% of observation time); 3 for continuous interruption by strong sensory stimuli such as opening the cage lid; and 4 for continuous, uninterrupted AIMS. Locomotive AIMS were rated for severity from 0 to 4 according to circular locomotion contralateral to the lesion. Axial AIMS were rated for severity from 0 to 4 and from 1 to 4 according to the degree of contralateral deviation of the head, neck or trunk: 1 for $\leq 30^\circ$, 2 for 31° to 59° , 3 for 60° to 89° , and 4 for $\geq 90^\circ$. Forelimb AIMS were also rated for severity from 0 to 4 and from 1 to 4 according to the amplitude of forelimb movements contralateral to the lesion: 1 for minimal oscillating movements, 2 for low-amplitude movements leading to forelimb translocation, 3 for forelimb translocation with shoulder contractions, and 4 for maximum amplitude forelimb movements. Orolingual AIMS were rated for severity from 0 to 4 according to jaw movements, tongue protrusion and facial stereotypic movements. Scores such as 1.5, 2.5 and 3.5 were added to enhance sensitivity of the ratings. AIMS scores were computed for each animal and session and expressed as locomotive AIMS and the sum of axial, forelimb and orolingual AIMS.

8.5.8 Western blot analysis

One hour after the last saline or L-DOPA injection, or at the end of the last day of continuous infusion, the animals were killed by decapitation, and their brains

removed for dissection. Striatum punches were immediately frozen on powdered dry ice and stored at -80°C until protein extraction. Samples were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing Tris-HCl, NaCl, Triton x-100 and sodium deoxycholate with protease and phosphatase inhibitor cocktails. Protein concentrations were quantified by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Western blot analyses were performed with equal amounts of protein (40 µg), separated on SDS/10% PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and immunoblotted overnight with selective primary antibodies. Primary antibody incubations were followed by several rinses in TBS/0.1% Tween 20 solution before second incubations with secondary HRP antibodies. Chemiluminescence reactions served to visualize protein bands, and immunoreactivity of the bands was analyzed quantitatively by Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland CA, USA). Densitometry was expressed as relative optical density.

8.5.9 Immunofluorescence

One h after the last saline or L-DOPA injection or at the end of the last day of continuous infusion, the animals were deeply anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with paraformaldehyde 4% (wt/vol) in PBS, pH 7.5. Their brains were removed and post-fixed overnight in the same solution and for a few h in 10% sucrose/4% paraformaldehyde (wt/vol) in PBS, pH 7.5. They were frozen in isopentane and stored at -80°C until used. Sections (60 µm) were sliced with a Leica CM3050S cryostat (Leica, Richmond Hill, ON, Canada) and kept at 4°C in PBS. Those containing the substantia nigra (-6.30 to -4.52 mm from the bregma) and striatum (-0.40 to 1.70 mm from the bregma) were processed for free-floating immunofluorescence. Briefly, the sections were incubated in permeabilizing solution containing 1.2% Triton X-100 in PBS for 20 min at room temperature. After several rinses in PBS, they were incubated for 1 h at room temperature in blocking solution containing 10% normal goat serum (NGS) in PBS. The sections were then rinsed in PBS

(2 X 10 min) and incubated overnight at 4°C in primary antibody diluted in a solution containing 0.3% Triton X-100 and 2% NGS in PBS. The following primary antibodies were tested: TH (1:2,000) and NeuN (1:200). The sections were rinsed (3 X 10 min) in PBS and incubated in appropriate secondary antibody, diluted in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% NGS for 1 h at room temperature. After several washes in PBS, they were incubated with Hoescht 33342 (1:10,000/PBS) for 15 min. Finally, the sections were rinsed several times in PBS and mounted in Vectashield medium on Superfrost slides for visualization under a confocal spinning disk microscope (MBF Bioscience, Williston, VT, USA).

8.5.10 Statistical analysis

The data, presented as mean average \pm SEM, were analyzed by 1-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls post hoc test as a measurement variable (protein levels, for example) and a nominal variable (treatments). Exceptions were the data in Figures 7.2B, 7.7E and 7.7F that were analyzed by 2-way ANOVA, followed by the post hoc Bonferroni test. The underlying reasons were that in Figure 7.2B, there were 1 measurement variable (Fig. 7.2B: relative TH levels; Figs. 7.7E and 7.7F: total AIMS scores/session) and 2 nominal variables (Fig. 7.2B: hemispheres and treatments; Figs. 7.5E and 7.5F: number of days and treatments). Analyses were performed by Graph Pad Prism version 5.0 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

8.6 Results

8.6.1 Validation of 6-OHDA-induced nigrostriatal dopamine denervation

85 rats were unilaterally injected with 6-OHDA in the MFB. Figure 8.1 describes the experimental design. The severity of depletion was evaluated 10 days after

surgery by measuring the contraversive rotation response to apomorphine (1 mg/kg s.c.). Rotations were scored for 30 min, and only complete (360°) turns were considered. Apomorphine did not produce any circling behaviour in sham rats, whereas 6-OHDA-lesioned animals presented low (1 turn/min) to severe (8 turns/min) contralateral turning (Fig. 8.2A). 60 individuals exhibiting more than 5 contralateral turns/min were selected for further study. This amount of contralateral turning in response to apomorphine challenge is well-known to correlate with more than 90% of nigrostriatal denervation (Papa et al., 1994; Schwarting and Huston, 1996). Fifteen days later, 2 groups of selected animals were implanted with an intrastriatal cannula connected via plastic tubing to ALZET mini-pumps for Rp-cAMPS infusion. Twenty-eight days after 6-OHDA lesions, all rats received either vehicle or L-DOPA injection twice daily or continuous infusion of vehicle or L-DOPA through ALZET mini-pumps for 21 days during which AIMS were evaluated at 4 time points. The animals were sacrificed 1 h after the last injection for histological and biochemical analyses. This protocol generated 7 groups, defined as follows: (1) Sham/vehicle, (2) 6-OHDA/vehicle, (3) 6-OHDA/pulsatile L-DOPA, (4) 6-OHDA/intrastriatal vehicle/pulsatile L-DOPA, (5) 6-OHDA/intrastriatal Rp-cAMPS/pulsatile L-DOPA, (6) 6-OHDA/continuous vehicle, (7) 6-OHDA/continuous L-DOPA.

The extent of 6-OHDA-induced nigrostriatal dopamine alterations was verified by Western blotting and immunofluorescence techniques with an antibody raised against TH. This rate-limiting enzyme for dopamine synthesis is widely used as a marker of dopaminergic depletion, but a loss of this phenotypic marker does not necessarily indicate dopamine cell death. No significant changes were observed in TH levels between the intact and vehicle-injected hemispheres of sham rats. In contrast, these levels were decreased by more than 90% in the lesioned hemisphere of 6-OHDA-injected rats treated or not with L-DOPA when compared with the intact side (Fig. 8.2B). Along with these data, TH immunoreactivity was also dramatically reduced in the striatum (Fig. 8.2C, top panel) and substantia nigra (Fig. 8.2C, bottom panel) of the lesioned hemisphere compared to the intact side. These results were in

accordance with previous studies (Sauer and Oertel, 1994; Deumens et al., 2002) and confirmed that 6-OHDA injection into the MFB evoked massive depletion in dopamine-producing neurons.

8.6.2 LID-associated increases in Δ FosB expression, ERK1/2 activation and DARPP-32 phosphorylation were prevented by intrastriatal inhibition of PKA

We investigated whether PKA inhibition, through intrastriatal infusion of Rp-cAMPS, altered Δ FosB levels in the striatum of dyskinetic animals. Δ FosB levels were assessed by Western blotting in tissue lysates from the striatum of sham and 6-OHDA-lesioned rats treated with vehicle or pulsatile L-DOPA alone or in combination with intrastriatal infusion of Rp-cAMPS. Striatal levels of Δ FosB in 6-OHDA-lesioned rats treated with vehicle were not different from those seen in sham-operated controls. However, pulsatile L-DOPA treatment in 6-OHDA-lesioned animals evoked a robust increment (6.7-fold) of Δ FosB levels. Remarkably, continuous intrastriatal infusion of Rp-cAMPS totally prevented this effect (Fig. 8.3A).

Whether PKA plays a role in the increased phosphorylation levels of DARPP-32 at threonine34 and activation of ERK1/2 in the striatum of dyskinetic animals has never been demonstrated. Therefore, we evaluated the levels of phosphorylated DARPP-32 and phosphorylated ERK1/2 in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats receiving Rp-cAMPS. Antibodies directed against DARPP-32 phosphorylated at threonine34, ERK1 phosphorylated at threonine202/tyrosine204 and ERK2 at threonine185/tyrosine187 were used for Western blot analysis. Experiments were performed on proteins extracted from the striatum of sham-operated rats or 6-OHDA-lesioned animals treated with vehicle or pulsatile L-DOPA alone or in combination with intrastriatal infusion of Rp-cAMPS. Phosphorylation levels of ERK1/2 and DARPP-32 in the striatum of 6-OHDA lesioned rats injected with vehicle were not different from those found in sham-operated controls (Figs. 8.3B and 8.3C). However, pulsatile L-DOPA treatment in denervated rats

induced a robust increase in the phosphorylation levels of both ERK1/2 (2.7-fold) (Fig. 8.3B) and DARPP-32 (1.6-fold) (Fig. 8.3C) compared to the controls. Total ERK1, ERK2 and DARPP-32 levels were unaffected between groups. Phosphorylated ERK1 levels followed the same pattern of change as phosphorylated ERK2 but are not shown to avoid crowding the figures. Intrastratial infusion of Rp-cAMPS in 6-OHDA-lesioned rats totally prevented the increased phosphorylation of both ERK1/2 (Fig. 8.3B) and DARPP-32 (Fig. 8.3C). Results for the 6-OHDA/intrastratial vehicle/pulsatile L-DOPA group were not different from those of the 6-OHDA/pulsatile L-DOPA group and are not reported to avoid crowding the figures. Altogether, these data suggested a central role for PKA in L-DOPA-induced striatal molecular reorganization in rats with 6-OHDA-induced dopaminergic neuronal deficits.

8.6.3 Δ FosB, p-ERK1/2 and p-DARPP-32 levels were unaffected by continuous L-DOPA infusion

Whether continuous L-DOPA infusion affects the molecular changes associated with pulsatile L-DOPA treatment is unclear. To answer this question, 6-OHDA lesioned rats were treated, for 21 days, with either pulsatile L-DOPA injection or continuous infusion of the drug through ALZET osmotic mini-pump. Δ FosB, pERK1/2 and p-DARPP-32 levels were assessed by Western blot techniques in tissue lysates from the striatum of sham and 6-OHDA-lesioned rats treated with pulsatile L-DOPA or continuous infusion of either vehicle or L-DOPA. In denervated rats, continuous L-DOPA infusions did not affect the expression levels of Δ FosB, which were increased by pulsatile L-DOPA treatment, as illustrated earlier (Fig. 8.4A). Similarly, phosphorylation of ERK2 at Thr185/Tyr187 and of DARPP-32 at Thr34 was unchanged by continuous L-DOPA infusion, whereas they were robustly elevated by pulsatile L-DOPA treatment (Figs. 8.4B and 8.4C). These results indicated that continuous L-DOPA delivery in unilaterally-denervated rats did not induce the 3 molecular markers of LID, which are known to be heightened by pulsatile L-DOPA treatment.

8.6.4 LID is associated with modification of cytoskeletal-associated proteins

Western blot techniques were performed on proteins extracted from the striatum of sham rats or 6-OHDA-lesioned animals treated with vehicle, pulsatile L-DOPA alone or in combination with intrastriatal Rp-cAMPS infusion, or continuous infusion of L-DOPA, to evaluate levels of total tau (phosphorylated and non-phosphorylated), phosphorylated tau at serine214, total stathmin or phosphorylated stathmin at serine16. Total tau levels were not affected between groups (data not shown). Phosphorylated tau levels in 6-OHDA-lesioned rats receiving vehicle or continuous L-DOPA treatments were not different from those observed in sham animals (Fig. 8.5A). However, pulsatile L-DOPA treatment in 6-OHDA-lesioned rats significantly increased the levels of tau phosphorylated at Ser214 (1.5-fold) compared to sham. Intrastriatal infusions of Rp-cAMPS prevented this elevation of phosphorylation levels. P-stathmin Ser16 levels were not different from those seen in sham rats in any of tested groups (Fig. 8.5B).

8.6.5 Continuous infusion of L-DOPA or intrastriatal PKA inhibition prevented LID

The accelerating rotarod test revealed that pulsatile L-DOPA treatment improved rotarod performances in 6-OHDA-lesioned rats (Fig. 8.6). This result was in agreement with a previous study and validated the efficacy of L-DOPA therapy for motor movement. The test also confirmed that the inhibitor Rp-cAMPS, administered in combination with L-DOPA, did not alter the beneficial effect of L-DOPA treatment. Moreover, continuous infusion of L-DOPA by ALZET mini-pump significantly improved rotarod performance. To examine whether continuous L-DOPA infusion or intrastriatal PKA inhibition prior to pulsatile L-DOPA treatment modulates the emergence of motor complications, AIMS were quantified and scored on 4 subtypes: forelimb, orolingual, axial and locomotive (Fig. 8.7). 6-OHDA-lesioned rats treated for 21 days with either

vehicle, pulsatile L-DOPA alone or in combination with intrastriatal Rp-cAMPS infusion, and rats receiving continuous L-DOPA infusion were evaluated for AIMS on days 0, 7, 14 and 21. Enhanced manifestations of normal behaviours, such as grooming, sniffing and gnawing, were excluded from the rating.

LID were scored according to a rat dyskinesia scale (Winkler et al., 2002), and AIMS were presented as locomotive or the sum of axial, limb and orolingual AIMS. Locomotive AIMS were distinguished from other AIMS because they do not necessarily provide a specific measure of dyskinesia induced by L-DOPA (Lindgren et al., 2007). Unilaterally-lesioned rats receiving vehicle did not exhibit locomotive, axial, limb or orolingual AIMS (Fig. 8.7). In contrast, rats treated with pulsatile L-DOPA developed significant locomotive AIMS (Fig. 8.7A) and severe axial, limb and orolingual AIMS (Fig. 8.7B). It is noteworthy that locomotive AIMS decreased slightly with time, whereas the other AIMS were somewhat increased after 21 days of treatment. Animals receiving intrastriatal Rp-cAMPS infusion in combination with pulsatile L-DOPA treatment exhibited significantly lower AIMS when compared to pulsatile L-DOPA alone (Fig. 8.7). These animals had higher AIMS scores than vehicle-treated, lesioned rats. Interestingly, continuous infusion of L-DOPA to 6-OHDA-lesioned animals did not produce signs of AIMS. The results suggested a partial role for PKA in the emergence of LID, whereas continuous administration of L-DOPA seemed to prevent motor complications.

8.7 Discussion

It is now well-established that brain dopamine depletion results in the enhanced responsiveness of striatal neurons of the direct striatonigral pathway after intermittent L-DOPA administration. For instance, several studies have demonstrated that LID may be produced by persistent hyperactivation of cAMP signalling in these neurons (see Santini et al., 2008 for review). The ability of dopamine to stimulate adenylyl cyclase and PKA via activation of D1 receptors is enhanced in Parkinsonism patients and in experimental animals following

dopamine depletion (Tong et al., 2004; Santini et al., 2008). This hyper-responsiveness, which most likely represents a compensation for the lack of striatal dopamine, is attributed to elevated levels and efficiency of $G\alpha_{olf}$ protein in Parkinsonism humans and monkeys (Herve et al., 1993; Corvol et al., 2004; Aubert et al., 2005). Interestingly, studies performed in MPTP-lesioned monkeys even found an association between LID and increased coupling between D1 receptors and $G\alpha_{olf}$ (Aubert et al., 2005). In the 6-OHDA lesioned rat model, increased striatal expression of Δ FosB transcription factors, phosphorylation levels of DARPP-32 and activation of ERK1/2 are among the biochemical modifications that show a strong positive correlation with LID severity (Andersson et al., 1999; Cenci, 2002; Gerfen et al., 2002; Winkler et al., 2002; Picconi et al., 2003; Pavon et al., 2006; Santini et al., 2007; Westin et al., 2007). In the present study, we followed the levels of these molecular correlates to investigate their relationship with PKA activity and established the effect of PKA inhibition. We demonstrated, for the first time, that intrastriatal PKA inhibition totally prevents the L-DOPA-induced increase in expression of Δ FosB, phosphorylation levels of DARPP-32 at threonine34 and activation of ERK1/2. We therefore confirm in vivo the close relationship between PKA and these important striatal signalling molecules. It is suggested that the persistent hyperactivation of cAMP signalling, which leads to PKA activation, might be produced by overactive signalling through D1 receptors. Accordingly to this idea, our results are in line with previous studies showing that concomitant administration of D1 dopamine receptor antagonist and L-DOPA entirely prevent up-regulation of the neuropeptide dynorphin, another molecular marker of LID that is associated with behavioural sensitization (Cenci et al., 1998; Van De Witte et al., 2002; St-Hilaire et al., 2005). Therefore, these data indicate that PKA plays a central role in molecular priming for dyskinesia by L-DOPA and aberrant D1-dependent molecular plasticity in the striatum.

Another significant finding is that intermittent L-DOPA treatment positively correlates with hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein τ .

This is consistent with previous studies showing that changes in dopamine levels of the rodent brain are associated with modification of cytoskeletal organization (Cyr et al., 2003; Sgambato-Faure et al., 2005; Allen et al., 2006; Lebel et al., 2007). For instance, our experiments demonstrate that persistently-elevated extracellular dopamine, in dopamine transporter knockout mice, elicits tau hyperphosphorylation (Cyr et al., 2003). Sgambato-Faure et al. (2005) underscored the significance of activity-regulated cytoskeletal upregulation in cytoskeletal modifications and the long-lasting action of chronically-administered L-DOPA. We believe that PKA activation is an important intermediary step in these processes. The first obvious evidence from our data is that PKA inhibition prevents elevated levels of phosphorylated tau induced by L-DOPA treatment. In addition, serine214 is well-known to be phosphorylated by PKA activation (Liu et al., 2004). It is noteworthy that in cell culture and brain slice models, we have recently determined that PKA activation by D1 dopamine receptor stimulation elicits robust tau hyperphosphorylation at serine214 (Lebel et al., 2009). Whether a relationship exists between hyperphosphorylated tau and synaptic plasticity changes during L-DOPA treatment is still unknown. However, our experiments suggest linkage between abnormal tau phosphorylation and LID. Similarly, tau phosphorylation is associated with striatal dysfunction and motor impairment in dopamine transporter knockout mice (Cyr et al., 2003; Cyr et al., 2005). It has been established that tau phosphorylation at Ser214, and especially Ser199-202 residues, reduces its ability to bind to microtubules, and this is typically associated with somatodendritic accumulation of hyperphosphorylated tau. For instance, in the brain of a mouse model in which tau hyperphosphorylation is observed at these residues (Tian et al., 2009), somatodendritic accumulation is reported in parallel with disrupted neural circuits and the behavioural phenotype, but without tau filament formation or cell death. In the same way, we did not believe that PKA-mediated tau phosphorylation would impair neuronal survival in our experiments. These mechanisms may well be relevant to non-neurodegenerative conditions involving dopamine neurotransmission. Because of its connection with PKA

activity, we also studied stathmin. It has been shown that phosphorylation at Ser16, a site phosphorylated by PKA, inhibits the microtubule-destabilizing effect of stathmin (Moreno and Avila, 1998). In our experiments, there were no significant effects of 6-OHDA alone, L-DOPA therapy or inhibition of PKA on either total protein or phosphorylation levels of stathmin at Ser16. Altogether, these data underscore the importance of tau in striatal neuronal activity and control of motor movement.

AIMS induced through repeated L-DOPA treatment in PD patients are thought to be the consequence of molecular adaptations that occur in response to repeated, intermittent dopamine receptor stimulation with consequent fluctuation of dopamine concentrations in the brain (Goulet et al., 1996; Chase, 1998; Calon et al., 2000; Chase and Oh, 2000; Nutt et al., 2000). Continuous L-DOPA infusion through various delivery routes, or by using long-lived dopamine agonists, provides temporally more stable dopamine replacement therapy, relieving dyskinesia while still producing an antiparkinsonian effect (Mouradian et al., 1990; Schuh and Bennett, 1993; Goulet et al., 1996; Calon et al., 2000; Nutt et al., 2000; Nyholm et al., 2003; Bychkov et al., 2007; Jackson et al., 2007; Odin et al., 2008). Along with these studies, our data show that continuous L-DOPA infusion, in contrast to intermittent treatment, is not accompanied by manifestation of AIMS in 6-OHDA-lesioned rats. The mechanisms behind differences between intermittent and continuous L-DOPA are not entirely understood, but it is proposed that intermittent L-DOPA induces non-physiological activation of dopamine receptors, particularly D1 dopamine receptors (Ariano et al., 1991). Our findings show that expression of Δ FosB, phosphorylation of DARPP-32 at threonine34 and activation of ERK1/2 were not increased after continuous L-DOPA administration. In conclusion, these data indicate that continuous L-DOPA administration prevents molecular adaptation from occurring when it is given intermittently and support the hypothesis that continuous dopaminergic stimulation is a compelling mode of administration to avoid motor complications.

With the accelerating rotarod test, we confirmed the efficacy of L-DOPA, delivered by either pulsatile or continuous mode, in ameliorating the motor performances of unilaterally-denervated rats. More importantly, however, continuous infusions of intrastriatal Rp-cAMPS did not alter this antiparkinsonian effect of L-DOPA. These data are interesting, considering possible exploitation of the inhibitor in clinically more relevant studies. Moreover, intrastriatal Rp-cAMPS infusion during L-DOPA treatment significantly prevents the emergence of AIMS. The fact that PKA inhibition only partially prevents the apparition of motor complications, despite its total suppression of LID molecular markers, is puzzling. This point somewhat questions the significance of the connection between Δ FosB, DARPP-32 and ERK1/2 and the emergence of LID that was suggested by others (Nishi et al., 1997; Greengard et al., 1998; Gerfen et al., 2002). In fact, the contribution of other signalling pathways in the induction of LID has been observed previously. For instance, it is postulated that the serotonergic (Dupre et al., 2008; Munoz et al., 2008) and glutamatergic (Blanchet et al., 1998; Blanchet et al., 1999; Konitsiotis et al., 2000) systems could be involved in the production of L-DOPA-induced motor complications. These studies prompt us to propose that the partial AIMS observed in our model, despite the presence of PKA inhibitor, could occur subsequently to activity of the serotonergic and/or glutamatergic systems.

In conclusion, our experiments provide evidence that intermittent administration of L-DOPA, but not continuous delivery, and PKA activation play a critical role in the molecular and behavioural induction of AIMS in 6-OHDA-lesioned rats. We show that a significant part of motor complications occurs subsequently to a persistently-sensitized response to L-DOPA and up-regulation of the PKA-mediated signalling pathway. In addition, to provoke significant changes in striatal gene expression, PKA activation results in abnormal tau phosphorylation that could possibly be the basis of cytoskeletal disorganization and long-term changes in striatal neuronal functions. Attenuation of PKA signalling, through its potential ability to reduce AIMS without affecting the antiparkinsonian efficacy of

L-DOPA, may have interesting clinical implications for the treatment of LID in PD patients.

Acknowledgments

We thank Dominic Bastien for his invaluable help with the surgical procedures. This work was supported by the Parkinson Society of Canada (MC) and the Canada Research Chair in Molecular Neuropharmacology (MC).

8.8 References

- Ahlskog, J. E., Muenter, M. D., 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord.* 16, 448-58.
- Allen, P. B., et al., 2006. Distinct roles for spinophilin and neurabin in dopamine-mediated plasticity. *Neuroscience.* 140, 897-911.
- Andersson, M., et al., 1999. Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 6, 461-74.
- Ariano, M. A., et al., 1991. Striatal D1 dopamine receptor morphochemistry following continuous or intermittent L-dopa replacement therapy. *Exp Neurol.* 112, 112-8.
- Aubert, I., et al., 2005. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol.* 57, 17-26.
- Bezard, E., et al., 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci.* 2, 577-88.
- Blanchet, P. J., et al., 1998. Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Mov Disord.* 13, 798-802.
- Blanchet, P. J., et al., 1999. Differing effects of N-methyl-D-aspartate receptor subtype selective antagonists on dyskinesias in levodopa-treated 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 290, 1034-40.
- Brotchie, J. M., et al., 1998. Opioid peptide precursor expression in animal models of dystonia secondary to dopamine-replacement therapy in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 78, 41-52.
- Bychkov, E., et al., 2007. Dopamine depletion and subsequent treatment with L-DOPA, but not the long-lived dopamine agonist pergolide, enhances activity of the Akt pathway in the rat striatum. *J Neurochem.* 102, 699-711.
- Calon, F., et al., 2000. Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol.* 47, S70-8.
- Cenci, M. A., 2002. Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Amino Acids.* 23, 105-9.

Cenci, M. A., et al., 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci.* 10, 2694-706.

Chase, T. N., 1998. Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine. *Neurology.* 50, S17-25.

Chase, T. N., Oh, J. D., 2000. Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications. *Ann Neurol.* 47, S122-9; discussion S129-30.

Corvol, J. C., et al., 2004. Persistent increase in olfactory type G-protein α subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson's disease. *J Neurosci.* 24, 7007-7014.

Cyr, M., et al., 2003. Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 11035-40.

Cyr, M., et al., 2005. Magnetic resonance imaging at microscopic resolution reveals subtle morphological changes in a mouse model of dopaminergic hyperfunction. *Neuroimage.* 26, 83-90.

Deumens, R., et al., 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 175, 303-17.

Doucet, J. P., et al., 1996. Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur J Neurosci.* 8, 365-81.

Dupre, K. B., et al., 2008. Effects of coincident 5-HT_{1A} receptor stimulation and NMDA receptor antagonism on L-DOPA-induced dyskinesia and rotational behaviors in the hemi-parkinsonian rat. *Psychopharmacology (Berl).* 199, 99-108.

Gerfen, C. R., et al., 2002. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci.* 22, 5042-54.

Goulet, M., et al., 1996. Dyskinesias and tolerance induced by chronic treatment with a D1 agonist administered in pulsatile or continuous mode do not correlate with changes of putaminal D1 receptors in drug-naïve MPTP monkeys. *Brain Res.* 719, 129-37.

Greengard, P., et al., 1998. The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Brain Res Rev.* 26, 274-84.

Herve, D., et al., 1993. G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci.* 13, 2237–2248.

Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2006. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis.* 9, 219-42.

Jackson, M. J., et al., 2007. Decreased expression of l-dopa-induced dyskinesia by switching to ropinirole in MPTP-treated common marmosets. *Exp Neurol.* 204, 162-70.

Konitsiotis, S., et al., 2000. AMPA receptor blockade improves levodopa-induced dyskinesia in MPTP monkeys. *Neurology.* 54, 1589-95.

Lebel, M., et al., 2007. Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci.* 34, 18-29.

Lebel, M., et al., 2009. Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways. *Neuropharmacology.* 57, 392-402.

Lindgren, H. S., et al., 2007. The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav Brain Res.* 177, 150-9.

Liu, S. J., et al., 2004. Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem.* 279, 50078-88.

Mazanetz, M. P., Fischer, P. M., 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 464-79.

Misra K., Pandey S. C., 2006. The decreased cyclic-AMP dependent-protein kinase A function in the nucleus accumbens: a role in alcohol drinking but not in anxiety-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology.* 31(7):1406-19.

Moreno, F. J., Avila, J., 1998. Phosphorylation of stathmin modulates its function as a microtubule depolymerizing factor. *Mol Cell Biochem.* 183, 201-9.

Mouradian, M. M., et al., 1990. Modification of central dopaminergic mechanisms by continuous levodopa therapy for advanced Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 27, 18-23.

Munoz, A., et al., 2008. Combined 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain.* 131, 3380-94.

- Nishi, A., et al., 1997. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci.* 17, 8147-55.
- Nutt, J. G., et al., 2000. Continuous dopamine-receptor stimulation in advanced Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, S109-15.
- Nyholm, D., et al., 2003. Optimizing levodopa pharmacokinetics: intestinal infusion versus oral sustained-release tablets. *Clin Neuropharmacol.* 26, 156-63.
- Obeso, J. A., et al., 2000. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, S2-7.
- Odin, P., et al., 2008. Continuous dopaminergic stimulation achieved by duodenal levodopa infusion. *Neurol Sci.* 29 Suppl 5, S387-8.
- Papa, S. M., et al., 1994. Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration. *Brain Res.* 662, 69-74.
- Pavon, N., et al., 2006. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry.* 59, 64-74.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego.
- Picconi, B., et al., 2003. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci.* 6, 501-6.
- Rascol, O., et al., 2000. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med.* 342, 1484-91.
- Santini, E., et al., 2007. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci.* 27, 6995-7005.
- Santini, E., et al., 2008. Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS J.* 275, 1392-9.
- Sauer, H., Oertel, W. H., 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience.* 59, 401-15.
- Schuh, L. A., Bennett, J. P., Jr., 1993. Suppression of dyskinesias in advanced Parkinson's disease. I. Continuous intravenous levodopa shifts dose response

for production of dyskinesias but not for relief of parkinsonism in patients with advanced Parkinson's disease. *Neurology*. 43, 1545-50.

Schwartz, R. K., Huston, J. P., 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*. 50, 275-331.

Sgambato-Faure, V., et al., 2005. Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 64, 936-47.

St-Hilaire, M., et al., 2005. Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol Dis*. 20, 450-60.

Tian, Q., et al., 2009. Biphasic effects of forskolin on tau phosphorylation and spatial memory in rats. *J Alzheimers Dis*. 17: 631-42.

Tong, J., et al, 2004. Brain dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol*. 55, 125-129.

Westin, J. E., et al., 2007. Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry*. 62, 800-10.

Winkler, C., et al., 2002. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis*. 10, 165-86.

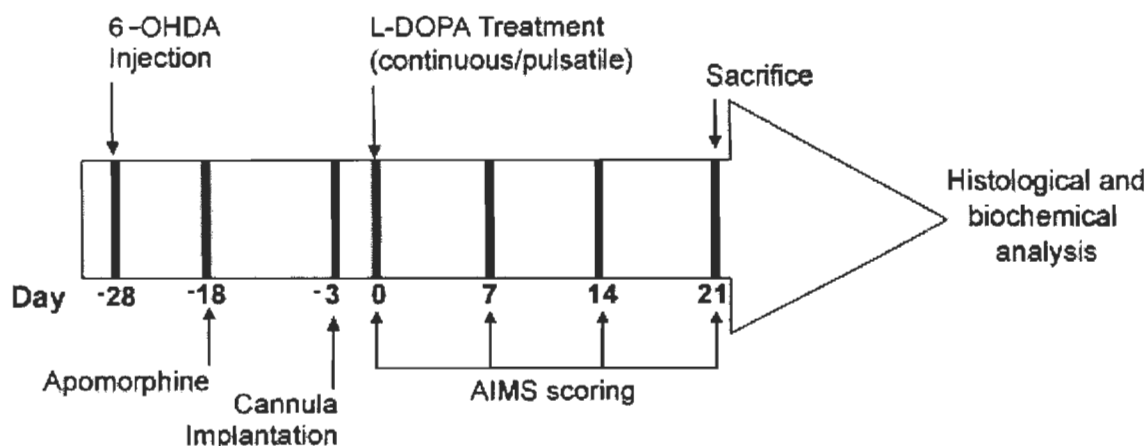


Figure 8.1 : Experimental design of the study

Rats ($n=85$) were unilaterally injected with 6-OHDA in the medial forebrain bundle (MFB). Contralateral turning behaviours after apomorphine injection were tested 10 days later. Fifteen days after the apomorphine test, 2 groups of selected animals were implanted with an intrastriatal cannula connected via plastic tubing to an ALZET mini-pump; one group received vehicle infusion, and the other group, Rp-cAMPS infusion. Twenty-eight days after 6-OHDA lesions, groups of selected animals were given, for 21 days, either vehicle or L-DOPA injections s.c. twice daily or through ALZET mini-pumps for continuous infusion. AIMS were evaluated during this period, at days 0, 7, 14 and 21. The animals were sacrificed 1 h after the last injection for histological and biochemical analysis. This protocol generated 7 groups defined as follows: (1) Sham/vehicle, (2) 6-OHDA/vehicle, (3) 6-OHDA/pulsatile L-DOPA, (4) 6-OHDA/intrastriatal vehicle/pulsatile L-DOPA, (5) 6-OHDA/intrastriatal Rp-cAMPS/pulsatile L-DOPA, (6) 6-OHDA/continuous vehicle, (7) 6-OHDA/continuous L-DOPA.

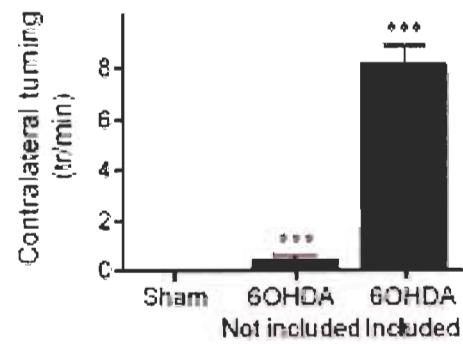
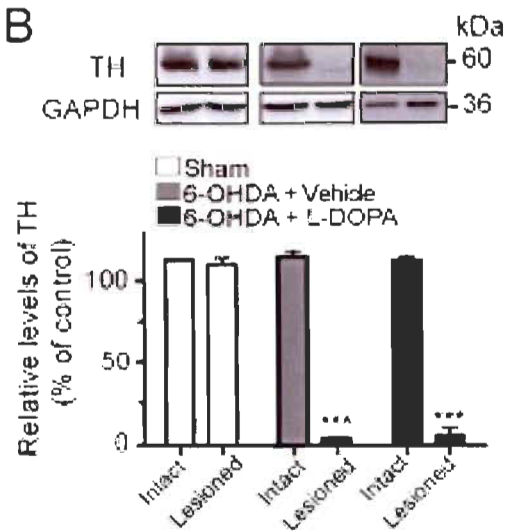
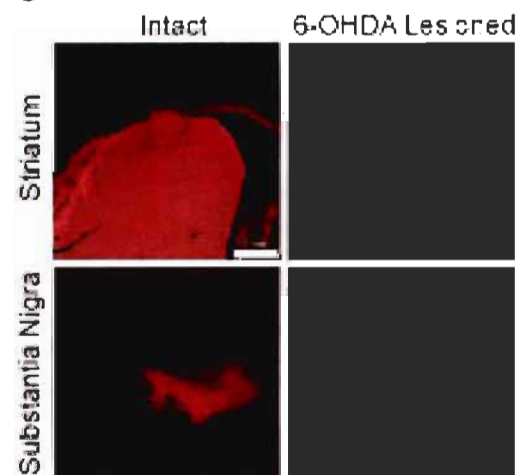
A**B****C**

Figure 8.2 : Extent of the dopaminergic denervation induced by 6-OHDA lesions

(A) Numbers of contralateral rotations after apomorphine (1 mg/kg, s.c.) treatment of sham-operated or 6-OHDA-lesioned animals not included (≤ 5 turns, $n=25$) or included (>5 turns, $n=60$) in this study. The data represent the mean of turns per min \pm SEM. *** $p<0.001$ vs sham animals. Statistical analysis was performed by 1-way ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test. (B) Tyrosine hydroxylase (TH) levels were evaluated by Western blotting of proteins extracted (40 μ g protein) from the striatum of unilaterally sham-operated or 6-OHDA-lesioned rats treated with vehicle or L-DOPA. The data, expressed relative to GAPDH levels, represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm SEM; values are from quadruplicate experiments/animal, $n=4$ rats/group. Control values are from the intact hemisphere of sham-operated rats. *** $p<0.001$ vs sham-intact hemisphere. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test. (C) Representative examples of TH immunofluorescence studies in 6-OHDA-lesioned rats. Shown are a coronal section of the striatum and one of the substantia nigra from an intact (left panels) and lesioned (right panels) hemisphere. The scale bar represents 1 mm.

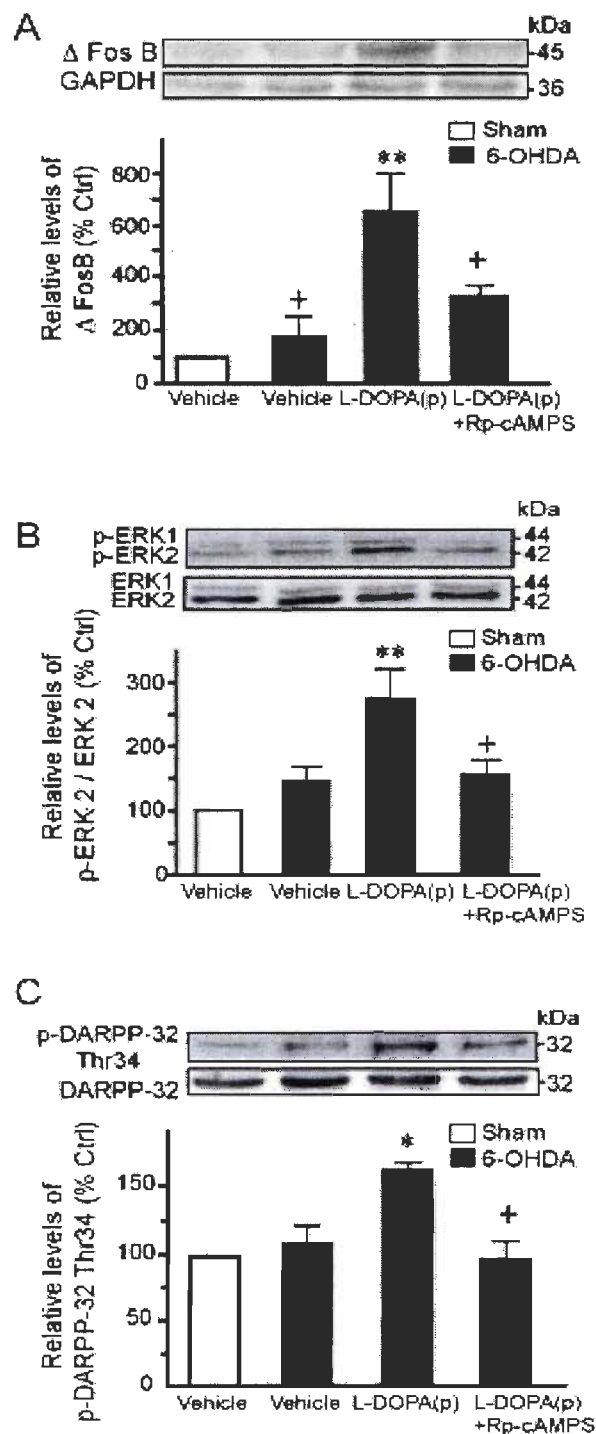


Figure 8.3 : Intrastriatal Rp-cAMPS infusions prevented increased levels of Δ FosB, p-ERK1/2 and p-DARPP-32 Thr34 after pulsatile L-DOPA treatment

Protein levels were evaluated by Western blotting of proteins extracted (40 μ g protein) from the striatum of the rat brain. They were assessed in extracts from sham or 6-OHDA-lesioned rats treated with vehicle, pulsatile L-DOPA (p) or pulsatile L-DOPA in combination with intrastriatal infusion of the PKA inhibitor Rp-cAMPS. Shown are: (A) Δ FosB levels expressed relative to GAPDH levels, (B) phosphorylated ERK2 levels at Thr185/Tyr187 expressed relative to total ERK2 levels, and (C) phosphorylated DARPP-32 levels at Thr34 expressed relative to total DARPP-32 levels. The data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of respective control values) \pm SEM; values are from triplicate experiments/animal, n=4 rats/group. **p<0.01 and *p<0.05 vs respective control and +p<0.001 vs pulsatile L-DOPA treatment. Statistical analysis was performed by 1-way ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

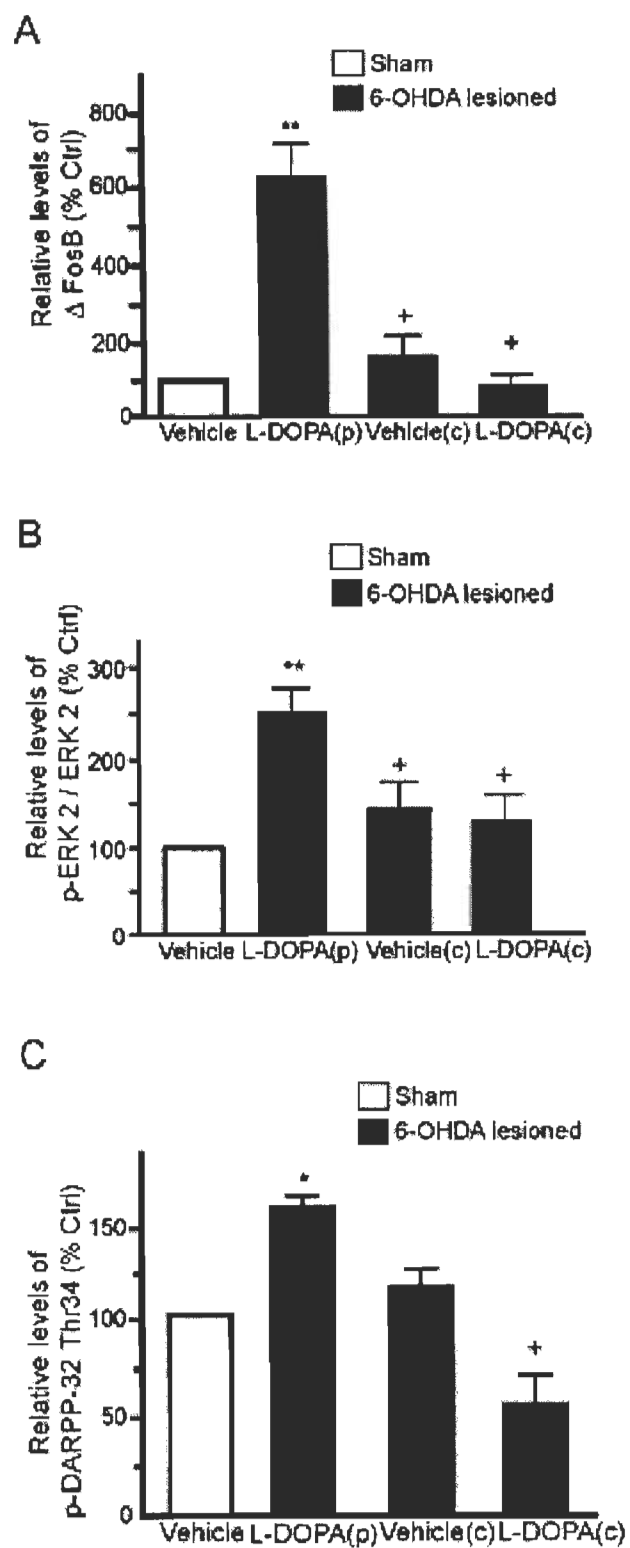


Figure 8.4 : Continuous L-DOPA infusion affected levels of Δ FosB, p-ERK1/2 and p-DARPP-32 Thr34

Protein levels were evaluated by Western blotting of proteins extracted (40 µg protein) from the striatum of the rat brain. Proteins levels were assessed in extracts from the striatum of sham or 6-OHDA-lesioned rats treated with vehicle, pulsatile (p) or continuous (c) L-DOPA. (A) Δ FosB levels were expressed relative to GAPDH levels. (B) Phosphorylated ERK2 levels at Thr185/Tyr187 were expressed relative to ERK2 levels. (C) Phosphorylated DARPP-32 levels at Thr34 were expressed relative to DARPP-32 levels. The data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of respective control values) \pm SEM; values are from triplicate experiments/animal, n=6 rats/group. **p<0.01 and *p<0.05 vs the respective controls and *p<0.001 vs pulsatile L-DOPA treatment. Statistical analysis was performed by 1-way ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

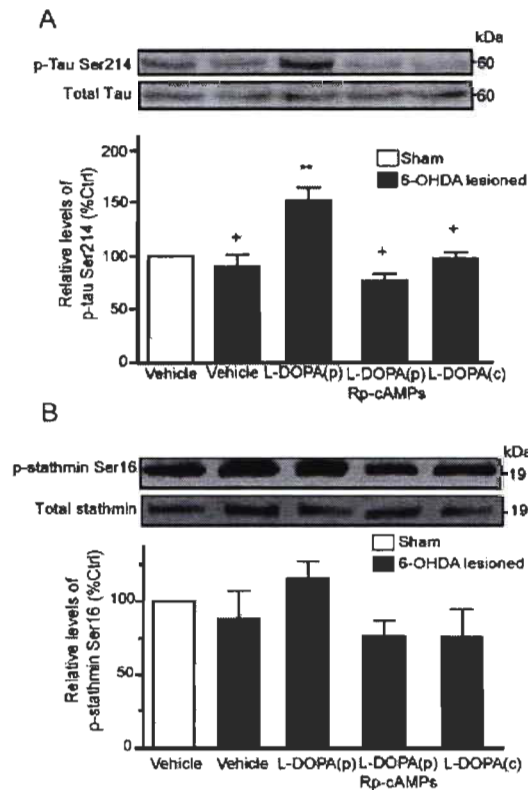


Figure 8.5 : LID were associated with increased levels of phosphorylated tau

Protein levels were evaluated by Western blotting of extracts (40 µg protein) from the striatum of the rat brain. They were quantified in sham or 6-OHDA-lesioned rats treated with vehicle, pulsatile L-DOPA alone or in combination with intrastriatal infusion of the PKA inhibitor Rp-cAMPS or continuous L-DOPA infusion. (A) Phosphorylated tau levels at serine214 were expressed relative to total tau levels. (B) Phosphorylated stathmin levels at serine16 were expressed relative to total stathmin levels. The data represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of respective control values) ± SEM; values are from triplicate experiments/animal, n=4 rats/group. **p<0.01 vs respective controls and + p<0.001 vs pulsatile L-DOPA treatment. Statistical analysis was performed by 1-way ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

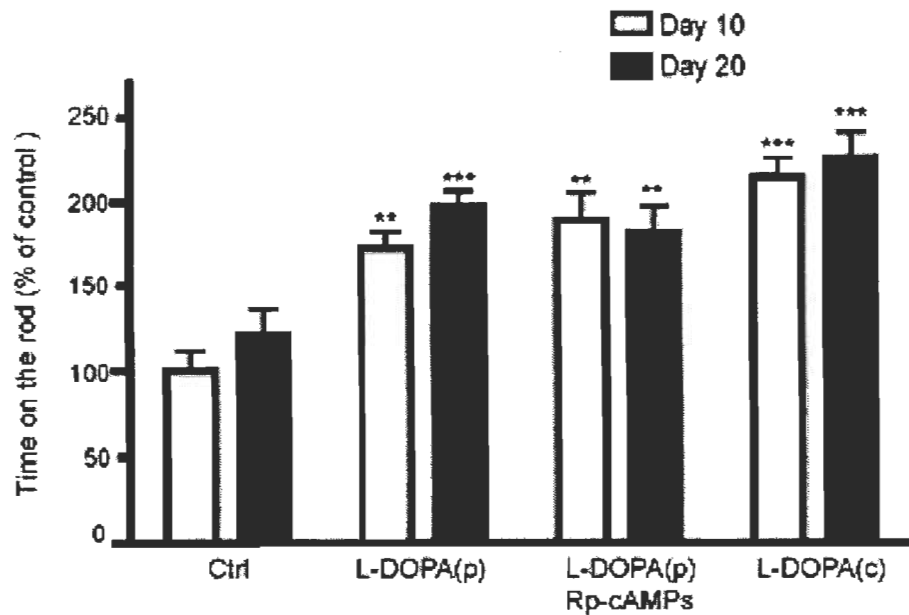


Figure 8.6 : Pulsatile L-DOPA, pulsatile L-DOPA in combination with intrastriatal infusion of PKA inhibitor or continuous L-DOPA treatment improved accelerating rotarod performances

Accelerating rotarod performances were measured on days 10 and 20 after the beginning of pharmacological treatments in 6-OHDA-lesioned rats (Ctrl). The data represent the mean of time spent on the rod (expressed as a percentage of Ctrl values) \pm SEM; values are from 4 to 6 rats/group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs Ctrl (6-OHDA + vehicle). Statistical analysis was performed by 1-way ANOVA, followed by the Neuman-Keuls post hoc test.

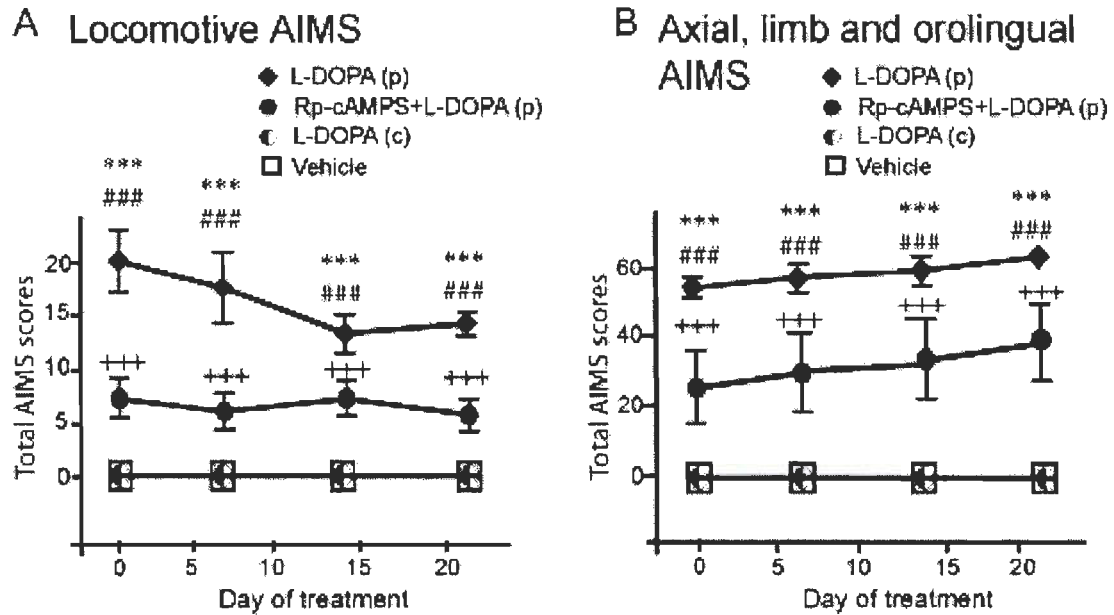


Figure 8.7 : Effect of continuous L-DOPA infusion or intrastriatal PKA inhibition prior to L-DOPA treatment on AIMS

AIMS were recorded in animals receiving vehicle, continuous L-DOPA (L-DOPA(c)), pulsatile L-DOPA (L-DOPA(p)) injection alone or in combination with intrastriatal infusion of PKA inhibitor, Rp-cAMPS. (A) Time course (days) of total AIMS score/session for locomotive AIMS. The data represent the mean of total locomotive rating per testing day \pm SEM. (B) Time course (days) of total AIMS score/session for axial, limb and orolingual AIMS. The data represent the mean of the sum of axial + limb + orolingual rating per testing day \pm SEM. $n=6$ rats/group. *** $p<0.001$ vs animals receiving vehicle or L-DOPA(c). #### $p<0.001$ vs animals receiving Rp-cAMPS + L-DOPA(p). +++ $p<0.001$ vs animals receiving vehicle or L-DOPA(c). Statistical analysis was performed by 2-way repeated-measures ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test.

CHAPITRE 9

CONCLUSION

L'augmentation des niveaux de dopamine extracellulaire est de plus en plus rapportée pour induire des modifications dans la signalisation cellulaire qui pourraient jouer un rôle clé dans l'organisation structurale des neurones et la connectivité interneuronale. En se basant sur les résultats d'études démontrant que des niveaux élevés de dopamine synaptique, résultant de manipulations pharmacologiques ou génétiques, pourraient induire des modifications de la densité des synapses et l'hyperphosphorylation de la protéine tau chez le rongeur (Cyr *et coll.* 2003; Lee *et coll.* 2005), nous avons investigué le rôle de la stimulation des récepteurs dopaminergiques dans les modifications de protéines structurales du cytosquelette tel que la protéine tau.

9.1 L'activation des récepteurs dopaminergiques D1, et non D2, provoque l'hyperphosphorylation de tau et les kinases PKA, Cdk5 et GSK3 jouent un rôle clé dans ce processus

Des évidences de la littérature suggèrent que la forskoline, un activateur puissant de la PKA, ainsi qu'un agoniste des récepteurs $\beta 1$ adrénergiques couplés aux protéines G_s , l'isoprotérénol, sont capable d'induire une hyperphosphorylation de la protéine tau (Liu *et coll.* 2004; Sun *et coll.* 2005; Sengupta *et coll.* 2006). Toutefois, il n'a jamais été rapporté, dans la littérature, que l'activation des récepteurs dopaminergiques pouvait être directement liée à ce phénomène.

Nos résultats constituent la première mise en évidence d'un lien direct entre la stimulation des récepteurs dopaminergiques, spécifiquement les récepteurs D1, et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. En effet, le premier résultat intéressant que nous avons obtenu fût de démontrer que dans les cellules SK-N-MC et les tranches de striatum, l'utilisation d'un agoniste sélectif des

récepteurs D1 était en mesure d'activer suffisamment la PKA, une protéine centrale à la signalisation des récepteurs D1, pour induire une augmentation importante des niveaux de phosphorylation de la protéine tau sur un site connu pour être modulé par cette kinase (Liu *et coll.* 2004; Zhang *et coll.* 2006). La suite de nos travaux a de plus mis en évidence le fait que l'augmentation des niveaux de phosphorylation de la protéine tau, suite à l'activation des récepteurs D1, n'est pas exclusive au site de phosphorylation modulé par la PKA mais que ce processus peut également se produire sur des sites qui sont connus pour être phosphorylés par les kinases Cdk5 et GSK3 (Mandelkow *et coll.* 1992; Paudel *et coll.* 1993; Hanger *et coll.* 2009; Tsai *et coll.* 2004) qui, tout comme PKA, font partie des kinases les plus susceptibles de phosphoryler tau (Gendron et Petrucelli 2009). Ces résultats mettent donc en évidence le rôle central de PKA, Cdk5 et GSK3 dans la phosphorylation de tau modulée par l'activation des récepteurs dopaminergiques D1.

L'utilisation du modèle de tranches de striatum, qui à la différence des SK-N-MC n'exprime pas exclusivement les récepteurs D1 mais tous les récepteurs dopaminergiques, nous a permis de démontrer que l'activation des récepteurs D2 n'était pas impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau. Ce résultat, ajouté au fait que l'hyperphosphorylation de tau suite à l'activation des récepteurs D1 est observée aussi bien dans les cellules SK-N-MC que dans les tranches de striatum, nous permet de mettre en évidence le rôle spécifique et sélectif des récepteurs dopaminergiques D1 dans ce phénomène. Bien que le lien entre l'augmentation des niveaux de dopamine et des niveaux de phosphorylation de la protéine tau aient déjà été mis en évidence auparavant, ces données constituent les premières évidences d'un lien direct entre l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 et des modifications de l'une des principales protéines responsables du maintien du cytosquelette neuronal, la protéine tau.

9.2 Suite à la stimulation des récepteurs D1, l'activité de Cdk5 et de GSK3 est augmentée via un processus dépendant de l'activation de la PKA et de l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire

La démonstration de l'implication de Cdk5 et de GSK3 dans l'augmentation des niveaux de phosphorylation de la protéine tau nous a amenés à investiguer la possibilité que les niveaux d'expression ou d'activation de ces kinases étaient possiblement augmentés suite à la stimulation des récepteurs D1. Nous avons tout d'abord démontré que, dans ces conditions, les niveaux d'expression de Cdk5 et de GSK3 n'étaient pas modifiés. Toutefois, par l'utilisation de moyens pharmacologiques, nous avons pu démontrer que suite à l'activation des récepteurs D1, l'activation de la PKA serait associée à une augmentation des niveaux intracellulaires de calcium suffisamment importante pour induire directement l'activation de GSK3 β , par sa phosphorylation sur la tyrosine 216 et indirectement l'activation de Cdk5, via la stimulation de la calpaïne et le clivage de p35 en p25. Dans ces conditions Cdk5 et GSK3 β seraient en mesure de provoquer l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Nos résultats suggèrent donc un rôle central pour le calcium dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau.

Par quels mécanismes l'activation des récepteurs D1 peut-elle entraîner l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaires? De plus en plus d'évidences suggèrent que la dopamine pourrait induire ce phénomène via l'activation des récepteurs D1 et la potentialisation de l'activité des récepteurs glutamatergiques (Flores-Hernandez *et coll.* 2002). Il a été démontré *in vivo*, que l'effet facilitant de la dopamine sur la réponse des récepteurs NDMA pourrait se produire via la phosphorylation des sous-unités NR1 de ces derniers (Snyder *et coll.* 1998). La phosphorylation des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA pourrait également être modulée par la PKA (Santini *et coll.* 2007). Rajadhyaksha a de plus suggéré que la cascade de signalisation des récepteurs D1, via l'activation de la PKA, aurait un effet direct sur le « trafficking » des récepteurs AMPA et NMDA dans le striatum de rats

(Rajadhyaksha *et coll.* 1998). D'autres mécanismes ont également été proposés pour être à la base de la potentialisation de l'activité des récepteurs glutamatergiques, par exemple une augmentation de l'expression de surface des récepteurs NMDA suite à la stimulation des récepteurs D1 (Hallett *et coll.* 2006) ou encore l'interaction directe protéine-protéine des récepteurs D1 et NMDA (Lee *et coll.* 2002). Un autre moyen par lequel l'activation des récepteurs D1 pourrait provoquer une augmentation importante des niveaux de calcium intracellulaires serait suite à l'activation des canaux calciques de type L (Surmeier *et coll.* 1995). En effet, l'activation des récepteurs D1, via l'augmentation de niveaux d'AMPC et l'activation de la PKA, pourraient induire la phosphorylation et l'activation des sous-unités Cav1.2/1.3 des canaux calciques de type ce qui se traduirait par une entrée massive de calcium dans la cellule (Surmeier *et coll.* 2007).

Bien que nos résultats démontrent que le récepteur dopaminergique D2 ne soit pas impliqué dans la phosphorylation de tau, il est connu que ce dernier est en mesure d'induire des changements dans les niveaux de calcium intracellulaires. En effet, la stimulation des récepteurs D2, via la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G_i/G_o , provoque l'activation de la PLC β_1 et ainsi la mobilisation du calcium cytoplasmique (Hernandez-Lopez *et coll.* 2000). Toutefois, cette modification des niveaux de calcium intracellulaires résulterait en l'activation de la calcineurine et en l'inactivation des sous-unités Cav1.2/1.3 des canaux calciques de type L (Hernandez-Lopez *et coll.* 2000 ; Surmeier *et coll.* 2007). L'activation des récepteurs D2 induirait donc de faibles fluctuations ioniques dans la cellule lesquels seraient insuffisants pour activer les kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau.

Quelles sont les conséquences d'une augmentation importante des niveaux intracellulaires de calcium? Des indications suggèrent que ce phénomène pourrait être à la base de modifications dans la plasticité synaptique et être impliqué dans la perte neuronale (voir Matton 2007 pour revue). L'implication de la signalisation des récepteurs D1 dans la régulation de la plasticité synaptique,

bien que peu connue, est de plus en plus suggérée et serait soupçonnée d'être partiellement dépendante des récepteurs NMDA. Il a en effet été proposé qu'une augmentation de la transmission dopaminergique serait en mesure d'activer les récepteurs NMDA, menant ainsi à l'entrée massive de calcium dans la cellule (Lee *et coll.* 2002; Zhang *et coll.* 1998; Cepeda *et coll.* 1998) et à l'initiation de signaux cellulaires associés à la mort neuronale (Lang *et coll.* 2005). La relation étroite entre les systèmes de neurotransmission dopaminergiques et glutamatergiques pourrait donc être à la base de mécanismes moléculaires pouvant expliquer, du moins en partie, les phénomènes apoptotiques induits par la dopamine via un processus d'excitotoxicité.

9.3 La phosphorylation de tau se produit de façon transitoire suite à la stimulation des récepteurs D1 et n'affecte pas la viabilité des neurones du striatum

Pour jouer son rôle physiologique dans l'organisation du cytosquelette des neurones, la protéine tau nécessite un certain niveau de phosphorylation. Toutefois, lorsqu'elle devient hyperphosphorylée sur certains résidus, la protéine tau pourrait être au cœur de processus neurodégénératifs et à long terme mener à la mort cellulaire (Stoothoff et Johnson 2005).

Nos études de la phosphorylation de tau en fonction du temps nous ont permis d'établir que ce processus se produisait de façon transitoire dans les neurones du striatum de telle sorte que les niveaux de phosphorylation de tau atteignent leur maximum à trois heures et retrouvent un niveau de base après six heures. Des résultats divergents ont toutefois été observés dans les modèles cellulaires, probablement en raison des différences existant entre les neurones post-mitotiques du striatum et les cellules SK-N-MC se divisant en culture. Il est intéressant de noter que dans les SK-N-MC, où la phosphorylation de tau augmente de façon graduelle et reste élevée tout au long du traitement, l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 et l'hyperphosphorylation

résultante de tau sont associés à la diminution de la viabilité cellulaire tel que mesuré par MTT. Toutefois dans des conditions où la phosphorylation de tau est transitoire, tel que ce qui a été observé dans les tranches de striatum, aucun dommage cellulaire n'a été observé. Cela suggère l'intéressante possibilité que l'hyperphosphorylation persistante de tau puisse provoquer des changements organisationnels associés à des perturbations des processus de divisions cellulaires qui pourraient résulter en la perte de cellules. Par exemple, il a récemment été suggéré que la protéine tau serait impliquée dans la stabilité des chromosomes via son interaction avec les microtubules et la chromatine (Rossi *et coll.* 2008). Tau est également connue pour interagir avec l'actine et dans des conditions où la protéine est hyperphosphorylée, des changements dans le cytosquelette et la morphologie cellulaire pourrait être observés (Fulga *et coll.* 2007). La dynamique de polymérisation des microtubules est critique pour la formation du fuseau mitotique et le bon déroulement des processus de division cellulaire. Par conséquent, la phosphorylation anormale de tau serait susceptible de provoquer des perturbations importantes dans la division et la réplication cellulaires. Ceci constitue une avenue intéressante à explorer pour la suite de ces travaux.

Le fait que la phosphorylation de tau se produise de façon transitoire dans le striatum et que ce phénomène ne soit pas associé à des dommages cellulaires pourrait sembler à l'encontre de ce qui est largement véhiculé dans la littérature. En effet, plusieurs études ont démontré que l'hyperphosphorylation de la protéine tau serait associée à la dégénérescence neuronale dans plusieurs maladies neurodégénératives tel que l'Alzheimer (voir Gendron et Petrucelli 2009 pour revue). Par exemple, il a été mis en évidence que les filaments et enchevêtrements neurofibrillaires, formés d'agrégats de la protéine tau hyperphosphorylée, feraient partie des principales caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer (Iqbal et Grundke-Iqbal 2008) et que la présence de filaments de tau corrélait positivement avec la dégénérescence neuronale (Stoothoff et Johnson 2005). Nos travaux démontrent toutefois que la phosphorylation anormale de tau, induite suite à l'activation des récepteurs

dopaminergiques D1, ne résulte pas en la formation d'agrégats de la protéine et n'est pas associé à dégénérescence neuronale. Le caractère transitoire de la phosphorylation de tau ainsi que la nature à court terme de nos études pourrait possiblement expliquer ces différences.

L'hyperphosphorylation de tau a été proposée pour être un évènement précoce dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Braak et Braak 1995). Dans de telles conditions, la protéine ne serait plus en mesure d'exercer son rôle, résultant ainsi à une perte de fonctions physiologiques. La formation d'agrégats de tau apparaîtrait plus tard, dans les stades avancés de la maladie, conférant ainsi un caractère toxique à la protéine qui serait associé à la dégénérescence neuronale. Dans notre étude, l'hyperphosphorylation de tau suite à l'activation des récepteurs D1 est transitoire. Dans de telles conditions, la protéine ne serait pas en mesure de s'agréger, prévenant ainsi le gain de fonctions toxiques. Tau subirait plutôt une perte de fonctions physiologiques, suite à son hyperphosphorylation, résultant en son incapacité de stabiliser le cytosquelette ce qui pourrait potentiellement induire des changements dans l'organisation synaptique et perturber la transmission neuronale.

L'augmentation importante des niveaux de calcium intracellulaires accompagnant la stimulation des récepteurs D1 et résultant en l'hyperphosphorylation de la protéine tau pourrait également être un facteur contribuant à l'apparition des dérèglements de la transmission synaptique. En effet, il a été démontré, dans un modèle de la maladie de Parkinson, que la perte de neurones dopaminergiques serait attribuable à un dysfonctionnement des sous-unités Cav1.3 des canaux calciques de type L (Day *et coll.* 2006). Ces derniers seraient désinhibés dans de telles conditions (Hernandez-Lopez *et coll.* 2000) provoquant ainsi une augmentation importante des niveaux de calcium intracellulaires, ce qui pourrait induire le désassemblage du cytosquelette responsable de la morphologie des épines dendritiques (Oertner et Matus 2005) et agir sur des cascades signalétiques impliquées dans la plasticité synaptique (Rajadhyaksha *et coll.* 1998). Nos résultats, dans les cellules SK-N-MC et dans

les tranches de striatum de rats, démontrent que le calcium joue un rôle central dans la phosphorylation de la protéine tau induite suite à la stimulation des récepteurs dopaminergiques D1. Dans ces conditions la PKA serait en mesure d'activer les sous-unités Cav1.2/1.3 des canaux calciques de type L (Surmeier *et coll.* 2007), provoquant ainsi une entrée massive d'ions calciques dans la cellule. Il est donc logique de penser que dans ces conditions, le calcium pourrait induire des changements dans l'organisation structurale du cytosquelette et résulter en une perte de synapses et des perturbations dans la transmission neuronale.

La première partie de ces travaux de recherche a donc permis de mettre en évidence, pour la première fois, une cascade d'évènements moléculaires reliant l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 à l'hyperphosphorylation de la protéine tau. En effet, nous suggérons que suite à la stimulation des récepteurs D1, l'activation de la PKA, consécutive à l'augmentation des niveaux d'AMPc, serait associée à une élévation importante des niveaux de calcium intracellulaire, possiblement via l'activation des canaux calciques de type L. Cette importante concentration d'ions calciques induirait indirectement l'hyperactivation de Cdk5, via le clivage de p35 par la calpaïne, directement l'activation GSK3 β via la phosphorylation de sa tyrosine 216. Cdk5 et GSK3 β ainsi activées seraient en mesure d'hyperphosphoryler la protéine tau ce qui pourrait avoir une influence profonde sur l'organisation du cytosquelette sans toutefois être associé à dégénérescence cellulaire (Figure 9.1). Cette découverte pourrait avoir une importance capitale dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à des pathologies qui, sans être associées à la dégénérescence neuronale, seraient provoquées par une augmentation de la transmission dopaminergique comme c'est le cas, par exemple, des dyskinésies induites par la L-DOPA dans la maladie de Parkinson.

Suite à la mise en évidence d'une relation étroite entre l'activation des récepteurs dopaminergiques et l'hyperphosphorylation de la protéine tau dans des cellules en culture et des tranches de striatum, nous avons comme objectif

d'investiguer, *in vivo*, l'effet de l'augmentation des niveaux de dopamine sur les protéines structurales du cytosquelette neuronal. Nous nous sommes donc intéressés à étudier la possibilité que la maladie de Parkinson et les dyskinésies induites par la L-DOPA, toutes deux en lien avec des dysfonctions dans la transmission dopaminergique, pourraient être associées à des modifications des protéines responsables de l'organisation structurale des neurones.

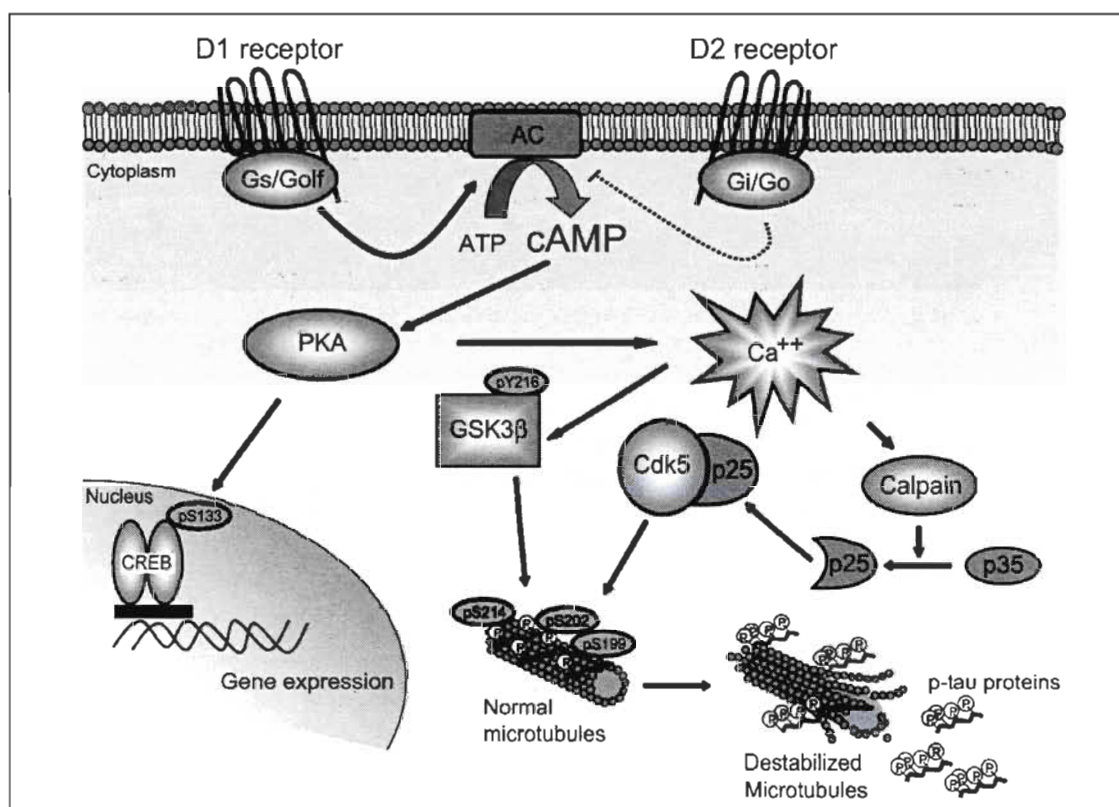


Figure 9.1 : Schéma des voies de signalisation proposées pour être associées avec la phosphorylation de tau induite par l'activation des récepteurs D1. (Tiré de Lebel *et coll.*, Canadian Journal of Neurological Science 34 (2007) 18-29).

La L-DOPA est un médicament qui est administré plusieurs fois par jour afin d'atténuer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. L'efficacité thérapeutique de cette molécule repose sur sa capacité, en se transformant en dopamine, de normaliser les niveaux du neurotransmetteur dans la synapse. Avec l'évolution de la maladie de Parkinson et la perte de neurones capables de moduler les niveaux de dopamine extracellulaire, une augmentation importante

du neurotransmetteur dans la synapse résulte en une stimulation chronique et intermittente des récepteurs dopaminergiques, reconnue pour être étroitement liée à l'émergence des dyskinésies. Ces complications motrices sont donc le résultat d'une stimulation non-physiologique des récepteurs dopaminergiques, reflétant les concentrations plasmatiques de L-DOPA, et sont principalement associées à des dysfonctions dans la signalisation de la voie striatonigrale (Santini *et coll.* 2008) exprimant principalement les récepteurs D1.

À travers la seconde partie de ce travail de recherche, nous avons investigué, chez le rat hémiparkinsonien, l'effet de la stimulation intermittente ou continue des récepteurs dopaminergiques par la L-DOPA ainsi que l'effet de l'inhibition de la PKA, une protéine centrale à la signalisation des récepteurs D1, sur l'expression de marqueurs connus des complications motrices, l'émergence des dyskinésies et les niveaux de phosphorylation de la protéine tau.

Le modèle que nous avons choisi d'utiliser est celui du rat hémiparkinsonien développant des mouvements anormaux involontaires suite à un traitement à la L-DOPA. Ce dernier constitue un modèle très intéressant et largement utilisé pour modéliser les maladies neurologiques (Schwartz et Huston 1996) mais présente toutefois certains désavantages. Par exemple, la perte de neurones dopaminergiques dans la substance noire compacte du rat hémiparkinsonien est très rapide et presque complète quelques jours après l'injection de la toxine. Chez l'humain, la maladie se développe de façon graduelle, sur plusieurs années. De la même façon, l'émergence des mouvements anormaux involontaires survient très rapidement après le début de la dopathérapie chez le rat hémiparkinsonien alors que chez l'humain, les dyskinésies se développent de façon graduelle, souvent sur plusieurs années (Jenner 2008). Le rat hémiparkinsonien, développant des mouvements anormaux involontaires suite au traitement à la L-DOPA a toutefois contribué de façon substantielle à l'avancement des connaissances fondamentales et cliniques (Cenci *et coll.* 2002; Lundblad *et coll.* 2002). Ce modèle, d'utilisation simple et peu coûteuse, est encore largement utilisé afin de mieux comprendre les bases moléculaires

des complications motrices et pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques expérimentales et cliniques pertinentes au traitement de la maladie de Parkinson et des dyskinésies induites par la L-DOPA.

L'étendue de la dénervation ainsi que la dose de L-DOPA administrée jouent un rôle très important dans le mode d'apparition des complications motrices. Étant donné que nous souhaitons obtenir un modèle avancé de la maladie de Parkinson, où l'étendue de la perte de neurones dopaminergiques est importante et que les complications motrices sont bien évidentes, nous avons injecté la toxine de façon à produire une perte massive des neurones de la voie nigro-striée et nous avons utilisé des doses de L-DOPA permettant d'induire d'importantes complications motrices. Les animaux ont tous développé des mouvements anormaux involontaires de bonne amplitude, dès la première injection du médicament, ce qui corrèle avec ce qui fût démontré précédemment (Lindgren *et coll.* 2007). Le modèle de rat hémiparkinsonien ainsi que le régime de traitement à la L-DOPA que nous avons choisis sont basés sur les résultats d'études antérieures et ont été utilisés puisqu'ils permettent l'évaluation précise des complications motrices ainsi que l'appréciation directe de l'efficacité des différents traitements étudiés.

9.4 L'expression des marqueurs connus des dyskinésies est prévenue par l'inhibition intrastriatale de la PKA ou l'infusion continue de L-DOPA. De plus, ces traitements préviennent de façon partielle ou totale l'émergence des complications motrices

Des dérèglements dans plusieurs systèmes de neurotransmission ont été proposés pour être impliqués dans l'émergence des dyskinésies suite à un traitement à la L-DOPA. Par exemple, plusieurs données suggèrent que l'organisation subcellulaire et les interactions fonctionnelles des récepteurs glutamatergiques dans le striatum semblent être cruciales dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson et dans l'émergence des dyskinésies (Hallett et Standaert 2004; Picconi *et coll.* 2008). De plus, des évidences récentes suggèrent l'implication de la sérotonine dans la maladie de Parkinson et le

développement des effets secondaires associés à la dopathérapie (Nicholson et Brotchie 2002). Toutefois, le rôle central du système dopaminergique dans l'apparition des complications motrices est de loin le mieux caractérisé. Il est bien établi dans la littérature que les neurones de la voie striatonigrale répondraient de façon excessive à la L-DOPA suite à la dégénérescence des neurones du striatum et à la déplétion en dopamine qui s'en suit (Santini *et coll.* 2008). Plusieurs études démontrent également que les dyskinésies induites par la L-DOPA seraient associées à une augmentation de la signalisation dépendante de l'AMPc (Santini *et coll.* 2008). À cet effet, il a été démontré, chez les patients parkinsoniens et les modèles animaux de la maladie de Parkinson, que lorsque la dopamine se raréfie au cerveau, les récepteurs D1 répondent de façon excessive à la présence du neurotransmetteur résultant en une augmentation importante de l'activité de l'adénylate cyclase et de la PKA (Tong *et coll.* 2004; Santini *et coll.* 2008). Un des mécanismes proposés pour expliquer ce phénomène serait une augmentation de l'expression et de l'efficacité de la protéine $G_{\alpha_{\text{off}}}$, protéine G stimulatrice associée à la signalisation des récepteurs D1 (Herve *et coll.* 1993; Corvol *et coll.* 2004; Aubert *et coll.* 2005). Plusieurs marqueurs de la signalisation des récepteurs dopaminergiques ont également été démontrés pour corrélérer positivement avec l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. En effet, les complications motrices sont accompagnées d'une augmentation importante des niveaux d'expression de ΔFosB , et également de la phosphorylation de DARPP-32 sur la thréonine 34 et de l'activation de ERK 1/2 (Cenci *et coll.* 1998; Andersson *et coll.* 1999; Winkler *et coll.* 2002; Pavon *et coll.* 2006; Sgambato-Faure *et coll.* 2005; Picconi *et coll.* 2003; Santini *et coll.* 2007; Gerfen *et coll.* 2002; St-Hilaire *et coll.* 2005). Nos résultats corrélaient avec ceux de la littérature et démontrent que suite à un traitement à long terme avec la L-DOPA, une augmentation importante des niveaux d'expression de ΔFosB , l'élévation des niveaux de phosphorylation de DARPP-32 sur la thréonine 34 ainsi que l'activation de ERK 1/2 sont observés dans le striatum des rats dyskinétiques. Tel que mentionné précédemment, la PKA est une protéine centrale à la signalisation des récepteurs

dopaminergiques D1. Les résultats de notre étude démontrent que le fait d'inhiber cette kinase, directement dans le striatum, prévient totalement les changements moléculaires induits par le traitement à la L-DOPA sur les marqueurs des dyskinésies. Notre étude supporte donc celles suggérant l'implication de la signalisation des récepteurs D1 dans l'induction des marqueurs des dyskinésies en plus de mettre en évidence, pour la première fois, le rôle central joué par la PKA dans ce processus.

L'inhibition intrastriatale de la PKA est également en mesure de prévenir de façon significative l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. En effet, la mesure des mouvements anormaux involontaires, par l'utilisation d'une échelle connue de l'évaluation des complications motrices (Winkler et coll. 2002), nous a tout d'abord permis de démontrer que les animaux recevant la L-DOPA ont tous développé des mouvements anormaux involontaires importants, et ce, dès la première injection du médicament. Ce résultat, en plus de concorder avec ceux qui démontrent qu'avec une dose comparable à celle que nous avons utilisée, les dyskinésies sont déjà intenses au jour 0 de traitement (Lindgren *et coll.* 2007), confirme l'efficacité de nos traitements à la L-DOPA. Les résultats que nous avons obtenus, chez les rats hémiparkinsoniens recevant un traitement à la L-DOPA en combinaison avec l'inhibiteur intrastriatale de la PKA, constituent toutefois la première démonstration de l'implication directe de la PKA dans l'émergence des dyskinésies. En effet, nous avons observé, chez ces animaux, une diminution partielle, mais significative de l'émergence des mouvements anormaux involontaires. En plus de mettre en évidence le rôle clé de la PKA, ces résultats suggèrent donc la contribution d'autres systèmes de neurotransmission dans l'apparition des dyskinésies induites par la L-DOPA. Ils remettent également en perspective le lien entre les complications motrices et les marqueurs moléculaires qui leur sont associés.

La stimulation intermittente des récepteurs dopaminergiques, conséquente à la fluctuation des niveaux de dopamine dans le cerveau, est proposée pour être à

la base de l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA (Goulet *et coll.* 1996; Chase 1998; Calon *et coll.* 2000; Chase et Oh 2000; Nutt *et coll.* 2000). Nos résultats supportent cette hypothèse puisque les rats hémiparkinsoniens recevant la L-DOPA en infusion continue ne développent pas de mouvements anormaux involontaires. Nos données démontrent également que, *in vivo*, l'infusion continue de L-DOPA n'affecte pas les niveaux d'expression des marqueurs des dyskinésies. Ceci suggère donc que l'administration continue de L-DOPA serait en mesure de prévenir l'apparition de changements moléculaires adaptatifs et soutient l'hypothèse que la stimulation dopaminergique continue pourrait constituer une avenue intéressante dans le but d'éviter l'émergence des complications motrices. Plusieurs études ont démontré l'efficacité antidyskinétique de différents modes d'infusion de L-DOPA ou de l'administration d'agonistes dopaminergiques à longue demie-vie (Mouradian *et coll.* 1990; Schuh et Bennett 1993; Goulet *et coll.* 1996; Calon *et coll.* 2000; Nutt *et coll.* 2000; Nyholm *et coll.* 2003; Bychkov *et coll.* 2007; Jackson *et coll.* 2007; Odin *et coll.* 2008). Par exemple, l'infusion duodénale ou intraveineuse de L-DOPA ou l'infusion sous-cutanée d'apomorphine, un agoniste dopaminergique, réduiraient de façon significative la sévérité des dyskinésies chez les patients parkinsoniens (Nyholm *et coll.* 2003; Mouradian *et coll.* 1990; Poewe et Wenning 2000). Toutefois, ces traitements sont très invasifs, coûteux et demandent des soins particuliers très difficiles et peu appréciés par les patients. De plus, il a récemment été démontré que l'administration transdermale de rotigotine, un agoniste dopaminergique non-ergoline, améliorerait l'efficacité antiparkinsonienne de ce médicament classiquement administré par voie orale tout en prévenant l'apparition des dyskinésies (Stockwell *et coll.* 2009). Toutefois, la faible solubilité du médicament à travers la barrière dermique ainsi que l'instabilité des différents produits utilisés constituent des obstacles majeurs à leur utilisation clinique. Ces nouvelles stratégies thérapeutiques requièrent plusieurs mises au point avant de pouvoir envisager leur utilisation clinique. La L-DOPA reste donc le meilleur traitement pour le contrôle des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Toutefois, comme ses effets secondaires

sont très invalidants, l'élaboration de formulations stables assurant une bonne réponse clinique constitue un défi à relever afin de minimiser les effets indésirables limitant l'utilisation de la L-DOPA.

9.5 L'inhibition intrastriatale de la PKA ou l'infusion continue du médicament n'affecte pas l'efficacité antiparkinsonienne de la L-DOPA

Les résultats de nos études étaient très prometteurs, mais il était impératif de vérifier si les traitements utilisés affectaient l'efficacité antiparkinsonienne de la L-DOPA et c'est en utilisant le test du rotarod que nous avons pu répondre à cette question. Ce dernier est largement utilisé afin d'évaluer la dextérité motrice et la coordination des animaux et il fût fréquemment employé afin d'évaluer les déficits moteurs dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson ainsi que pour apprécier l'amélioration des capacités locomotrices sous dopathérapie (Lundblad *et coll.* 2003; Picconi *et coll.* 2003; Lindgren *et coll.* 2007; Dekundy *et coll.* 2007). Il constitue donc un mode d'évaluation très adéquat de l'efficacité thérapeutique d'un traitement sur les performances motrices des animaux. Nos résultats démontrent que les animaux ayant reçu l'inhibiteur de PKA en combinaison avec le traitement à la L-DOPA ou encore ayant reçu le médicament en infusion continue présentent des performances motrices qui sont comparables à celles des rats sous dopathérapie conventionnelle. Ces résultats confirment donc que nos traitements n'affectent aucunement l'efficacité antiparkinsonienne déjà bien démontrée de la L-DOPA.

9.6 L'émergence des mouvements anormaux involontaires est associée à des modifications des protéines responsables du maintien du cytosquelette neuronal

En plus d'être accompagnées de modifications dans l'expression de certaines protéines ou facteurs de transcription (Cenci *et coll.* 1998; Andersson *et coll.* 1999; Winkler *et coll.* 2002; Pavon *et coll.* 2006; Sgambato-Faure *et coll.* 2005; Picconi *et coll.* 2003; St-Hilaire *et coll.* 2005), les dyskinésies sont fréquemment

comparées à une forme aberrante d'apprentissage moteur (Calabresi *et coll.* 2000a), suggérant qu'elles pourraient être associées à un remodelage des synapses et donc à des modifications dans les protéines responsables de l'organisation structurale des neurones. Tau est l'une des principales protéines associée aux microtubules et responsable de l'organisation du cytosquelette neuronal. Cette dernière est bien connue pour être impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives (Gendron et Petrucelli 2009) et nos études antérieures ont mis en évidence des modifications de cette protéine suite à l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 (Lebel *et coll.* 2009; Lebel et Cyr 2010). *In vivo*, nos résultats démontrent qu'une augmentation importante des niveaux de phosphorylation de tau est observée chez les rats dyskinétiques et que le mode d'administration de la L-DOPA ainsi que l'activation de la PKA jouent un rôle central dans ce processus. Il semble que tau ne soit pas la seule protéine associée au cytosquelette neuronal qui soit affectée par l'administration de L-DOPA puisqu'une augmentation importante des niveaux d'expression de la protéine ARC (activity-regulated cytoskeletal protein) a été rapportée chez le rat dyskinétique (Sgambato-Faure *et coll.* 2005). Des études récentes ont également démontré que, chez des souris dyskinétiques, l'administration de L-DOPA induisait, via les récepteurs D1, l'activation du complexe 1 de la protéine mTOR (mammalian Target of Rapamycin), impliquée dans plusieurs formes de plasticité synaptique (Santini *et coll.* 2009) et que l'administration d'un inhibiteur du complexe 1 de mTOR était capable de prévenir l'émergence des dyskinésies. Ces résultats corréleront donc avec ceux que nous avons obtenus et apportent une évidence de plus dans l'hypothèse que le remodelage des composantes du cytosquelette neuronal et des modifications dans la plasticité synaptique seraient susceptibles de faire partie des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA.

La relation entre l'hyperphosphorylation de la protéine tau et les changements synaptiques survenant au cours d'un traitement à la L-DOPA n'a jamais été directement démontrée. Toutefois, nos données suggèrent l'existence d'un lien étroit entre les dyskinésies et l'hyperphosphorylation de la protéine tau et

supportent les résultats d'études démontrant l'association de ce phénomène à l'apparition de déficiences motrices chez la souris DAT KO (Cyr *et coll.* 2003; Cyr *et coll.* 2005). Nous croyons, sans toutefois le démontrer, que bien qu'étant associée à l'apparition des dyskinésies, l'hyperphosphorylation de tau n'affecte pas la survie neuronale dans notre modèle. Il a d'ailleurs été démontré que la phosphorylation de tau, sur le site que nous avons étudié et qui est modulé par la PKA, diminue sa capacité de se lier aux microtubules, provoquant ainsi son accumulation somatodendritique et des perturbations des circuits neuronaux chez la souris sans toutefois être associée à la mort neuronale (Tian *et coll.* 2009). De plus, nos études *in vitro* et *ex vivo* ont démontré que la phosphorylation anormale de tau, induite suite à l'activation des récepteurs dopaminergiques D1, n'était pas accompagnée de la formation d'agrégats de la protéine et n'était pas associée à la dégénérescence neuronale (Lebel *et coll.* 2009 ; Lebel et Cyr 2010).

Qu'est-ce qui pourrait expliquer que l'hyperphosphorylation de la protéine tau associée à la dégénérescence neuronale dans la maladie d'Alzheimer (Gendron et Petrucelli 2009) ne serait pas associée à la perte cellulaire dans les dyskinésies induites par la L-DOPA? En plus de la présence de filaments et d'enchevêtrements neurofibrillaires formés d'agrégats de la protéine tau hyperphosphorylée, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de plaques séniles constituées de bêta-amyloïde ($A\beta$) (Iqbal et Grundke-Iqbal 2008). L'accumulation anormale d' $A\beta$ a été suggérée pour être responsable de la formation d'agrégats de la protéine tau (Lewis *et coll.* 2001, Alexander *et coll.* 2002) et serait même un médiateur essentiel de la neurotoxicité. Contrairement à la maladie d'Alzheimer, aucun lien n'a été démontré à ce jour entre la présence de plaques d' $A\beta$ et la maladie de Parkinson ou les dyskinésies induites par la L-DOPA. La protéine tau, dans ces pathologies, pourrait donc subir une perte de fonctions physiologiques, perturbant la stabilisation des microtubules, sans cependant être associée à un gain de fonctions toxiques, causant la neurodégénérescence. Il est toutefois très intéressant de noter que

des études récentes suggèrent la présence d'A β dans le cerveau de patients atteints de démence associée à la maladie de Parkinson (Compta *et coll.* 2009) qui survient dans des stades très avancés de la maladie. Dans ces conditions, la présence corticale de corps de Lewy, de lésions s'apparentant à celles observées dans la maladie d'Alzheimer en terme de tau hyperphosphorylée, ainsi que des agrégats d'A β ont été observés (Braak *et coll.* 2005; Aarsland *et coll.* 2005; Kalaitzakis *et coll.* 2008) et ce processus serait associé au déclin des fonctions cognitives chez les sujets atteints (Mollenhauer *et coll.* 2006). Ces résultats supportent donc l'hypothèse de l'implication de l'A β dans le gain de fonctions toxiques de la protéine tau.

Nos résultats *in vitro* et *ex vivo* ont mis en évidence le fait que le calcium jouait un rôle important dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite suite à la stimulation des récepteurs dopaminergiques. Nos résultats *in vivo* ont également mis en évidence que des niveaux élevés de protéine tau phosphorylée étaient présents dans le striatum de rats dyskinétiques. Il est connu dans la littérature que les récepteurs glutamatergiques sont impliqués dans les modifications des niveaux intracellulaires de calcium et des études récentes ont démontré une augmentation significative des récepteurs glutamatergiques métabotropiques GluR5 (mGluR5) chez le primate et chez l'humain dyskinétiques (Samadi *et coll.* 2008 ; Ouattara *et coll.* 2009). Ceci suggère donc que ces derniers pourraient être une cible potentielle intéressante pour l'élaboration de molécules antidyskinétiques. En ce sens, des modulateurs allostériques négatifs des récepteurs mGluR5, le MPEP et le MTEP, se sont montrés efficaces dans la prévention des complications motrices chez le rat (Yamamoto et Soghomonian 2009; Dekundy *et coll.* 2006) ainsi que chez le primate (Morin *et coll.* 2010). Ceci soulève donc l'intéressante possibilité que les inhibiteurs des récepteurs mGluR5, en plus de prévenir l'émergence des dyskinésies et l'augmentation intracellulaire de calcium, pourraient également empêcher l'hyperphosphorylation de la protéine tau, ce qui serait une possibilité à investiguer dans des travaux futurs.

L'ensemble des résultats de ces études *in vivo* démontrent que le mode d'administration de la L-DOPA ainsi que l'activation de la PKA joue un rôle clé dans l'émergence des dyskinésies. L'infusion continue du médicament ainsi que l'inhibition intrastriatale de la PKA serait en mesure de prévenir ou d'atténuer l'émergence des complications motrices tout en n'affectant pas l'efficacité antiparkinsonienne de la L-DOPA. Ils suggèrent également que l'hyperphosphorylation de la protéine tau pourrait constituer un nouveau mécanisme associé à l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA (Figure 9.2) et que le remodelage du cytosquelette neuronal pourrait potentiellement être impliqué dans ce phénomène.

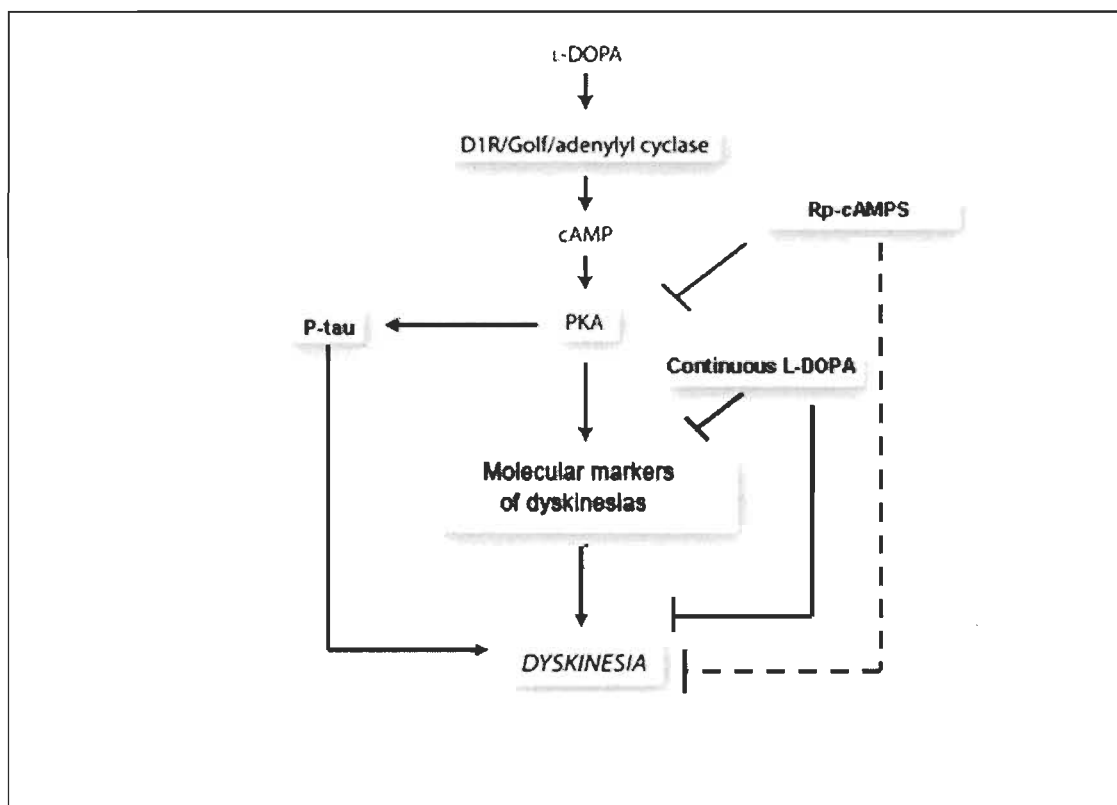


Figure 9.2 : Schéma des mécanismes moléculaires proposés pour être impliqués dans l'apparition des dyskinésies induites par la L-DOPA (Schéma constitué à partir de données tirées de Santini, E. *et coll*, FEBS journal 275 (2008) 1392-1399)

Plusieurs études ont jusqu'à présent mis en évidence le rôle central du système dopaminergique dans l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA en

démontrant une corrélation étroite entre certains changements moléculaires et l'émergence des complications motrices. Toutefois, l'issue de nos travaux constitue la première preuve du principe que la protéine centrale à la signalisation dopaminergique, la PKA, exerce un rôle prépondérant dans l'émergence des mouvements anormaux involontaires. Plusieurs facteurs font en sorte que l'inhibition de la PKA ne pourrait pas constituer une nouvelle stratégie thérapeutique dans le but de prévenir les effets secondaires de la dopathérapie. Toutefois nos résultats auront certainement contribué à une meilleure compréhension des changements adaptatifs qui surviennent dans le cerveau suite à l'administration répétée de L-DOPA. L'avancement des connaissances pourra permettre un jour le design de nouveaux agents thérapeutiques permettant le contrôle des symptômes parkinsoniens tout en évitant l'apparition d'effets secondaires contraignants, hypothéquant grandement la qualité de vie des patients atteints de la maladie de Parkinson.

9.7 Perspectives futures

Bien que nos résultats suggèrent que l'inhibition intrastriatale de la PKA serait en mesure d'atténuer de façon significative l'apparition de complications motrices sans affecter l'efficacité antiparkinsonienne de la L-DOPA, l'élaboration de molécules capables d'inhiber la PKA directement dans le striatum pourrait constituer un défi pharmacologique de taille. De plus, la PKA est une kinase impliquée dans la phosphorylation de plusieurs protéines de signalisation intracellulaire, ce qui signifie que son inhibition pourrait potentiellement provoquer l'apparition d'effets secondaires importants.

Par exemple, la LTP (long-term potentiation), qui avec la LTD (long-term depression) constituent deux formes de plasticités synaptiques jouant un rôle central dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, pourrait être affectée par l'inhibition de la PKA. En effet, il a été suggéré que l'induction de la LTP, modulée par la transmission des récepteurs AMPA dans les synapses cortico-striatales, requiert la stimulation post-synaptique de la PKA (Calabresi *et*

coll. 2000b; Centonze *et coll.* 2001) ainsi que l'activation de DARPP-32, protéine dépendante de la stimulation de la PKA (Centonze *et coll.* 2001). De la même façon, la LTP, induite via la transmission des récepteurs NMDA, pourrait se produire par la translocation des récepteurs intracellulaires vers la membrane synaptique et plusieurs évidences suggèrent un rôle pour la PKA dans le contrôle de la relocalisation des récepteurs NMDA (Lau et Zukin 2007). L'inhibition de la PKA pourrait donc, en empêchant l'induction de la LTP, avoir des impacts importants dans l'acquisition et la consolidation de la mémoire.

Comme l'inhibition de la PKA pourrait affecter des processus physiologiques de base et induire des effets secondaires majeurs, il serait important de poursuivre les travaux afin d'identifier d'autres mécanismes moléculaires qui pourraient potentiellement être impliqués dans les dyskinésies induites par la L-DOPA. Par exemple, l'identification de nouvelles protéines dans la cascade de signalisation des récepteurs dopaminergiques D1, susceptibles d'être impliquées dans l'émergence des dyskinésies, pourrait potentiellement permettre d'augmenter la spécificité des interventions thérapeutiques et d'éviter l'apparition d'effets indésirables importants. Les perspectives futures de ce projet de recherche seraient donc principalement orientées vers l'identification de nouvelles protéines qui pourraient potentiellement être impliquées dans l'induction des complications motrices et représenter des cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement des dyskinésies chez les patients parkinsoniens.

Nos résultats dans les cellules SK-N-MC et dans les tranches de striatum ont mis en évidence le fait que l'activité de Cdk5 était augmentée suite à la stimulation des récepteurs D1 et que ce processus était associé à l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Il a également été démontré que l'inhibition de Cdk5 était en mesure d'atténuer les changements neuronaux induits par la cocaïne sur les neurones de striatum de rats (Norrholm *et coll.* 2003; Fischer *et coll.* 2005) suggérant l'implication de la kinase dans le remodelage des synapses. Il serait donc intéressant d'investiguer l'implication de Cdk5 dans l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA d'autant

plus qu'une augmentation des niveaux d'expression de Cdk5 a été démontrée dans le striatum de singes dyskinétiques (Aubert *et coll.* 2005).

Des études sont présentement en cours dans notre laboratoire afin d'évaluer l'effet de l'inhibition intrastriatale de Cdk5 sur l'apparition des mouvements anormaux involontaires et les résultats préliminaires semblent très prometteurs. Toutefois, Cdk5 tout comme PKA, est une protéine essentielle au développement du système nerveux central et impliquée dans la régulation de plusieurs processus neuronaux. Son inhibition serait donc susceptible de provoquer des effets secondaires importants, c'est pourquoi il serait pertinent de s'intéresser à l'identification de substrats de Cdk5 qui pourraient potentiellement être impliqués dans l'émergence des dyskinésies et qui pourraient constituer des cibles pharmacologiques de choix pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Deux protéines qui ont récemment été identifiées pour être des substrats de Cdk5 sont WAVE-1 (Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin homologous protein-1) et Ephexin-1. Cdk5 régulerait la densité et la forme des épines dendritiques via, entre autres, la phosphorylation de WAVE-1, une des composantes critiques du cytosquelette d'actine (Kim *et coll.* 2006). La phosphorylation de WAVE-1 par Cdk5 empêcherait la polymérisation de l'actine par le complexe protéique Arp 2/3, résultant en la perte d'épines dendritiques. De la même façon, la phosphorylation par Cdk5 de l'Ephexine-1, une protéine impliquée dans le guidage axonal, mènerait à la diminution de la densité des épines dendritiques via la régulation de la GTPase RhoA (Fu *et coll.* 2007). La perte d'épines dendritiques subséquente à la phosphorylation de WAVE-1 et de l'Ephexine-1 par Cdk5 pourrait donc constituer un mécanisme potentiel par lequel Cdk5 serait en mesure d'influencer le remodelage des synapses et moduler des changements dans la plasticité synaptique potentiellement à la base de l'émergence de complications motrices suite à un traitement à long terme avec la L-DOPA.

Les dyskinésies induites par la L-DOPA semblent résulter de mécanismes intracellulaires très complexes impliquant probablement l'interaction de plusieurs protéines et systèmes de neurotransmission. La compréhension de ces mécanismes est donc cruciale puisque les dyskinésies hypothèquent grandement la qualité de vie de la majorité des patients atteints de la maladie de Parkinson. Les résultats de cette étude sont donc d'une grande importance puisqu'ils apportent des connaissances originales permettant l'identification de nouveaux processus moléculaires associés à l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA. Ces travaux auront participé à l'avancement des connaissances susceptibles de contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettront le contrôle des symptômes parkinsoniens sans toutefois être associées à l'apparition de complications motrices invalidantes.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Aarsland, D., Perry, R., Brown, A., Larsen, J.P. and Ballard C. (2005) "Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study", *Ann Neurol* 58:773–776.

Aarsland, D., Bronnick, K., Ehrt, U., De Deyn, P. P., Tekin, S., Emre, M. and Cummings, J. L. (2007) "Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated care giver stress", *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 36-42.

Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L. S., Weiss, R., Cooper, T. B., Mann, J. J., Van Heertum, R. L., Gorman, J. M. and Laruelle, M. (2000) "Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia", *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8104-9.

Abou-Sleiman, P. M., Healy, D. G., Quinn, N., Lees, A. J. and Wood, N. W. (2003) "The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease", *Ann Neurol* 54: 283-6.

Ahlijanian, M. K., Barrezueta, N. X., Williams, R. D., Jakowski, A., Kowsz, K. P., McCarthy, S., Coskran, T., Carlo, A., Seymour, P. A., Burkhardt, J. E., Nelson, R. B. and McNeish, J. D. (2000) "Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5", *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2910-5.

Ahlskog, J. E. and Muentner, M. D. (2001) "Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature", *Mov Disord* 16: 448-58.

Alexander, G.E., Chen, K., Pietrini, P., Rapoport, S.I. and Reiman, E.M. (2002) "Longitudinal PET Evaluation of Cerebral Metabolic Decline in Dementia: A Potential Outcome Measure in Alzheimer's Disease Treatment Studies", *Am J Psychiatry* 159(5):738-45.

Andersson, M., Hilbertson, A. and Cenci, M. A. (1999) "Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease", *Neurobiol Dis* 6: 461-74.

Anderton, B. H., Betts, J., Blackstock, W. P., Brion, J. P., Chapman, S., Connell, J., Dayanandan, R., Gallo, J. M., Gibb, G., Hanger, D. P., Hutton, M., Kardalidou, E., Leroy, K., Lovestone, S., Mack, T., Reynolds, C. H. and

Van Slegtenhorst, M. (2001) "Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation", *Biochem Soc Symp* 73-80.

Antonini, A. and Barone, P. (2008) "Dopamine agonist-based strategies in the treatment of Parkinson's disease", *Neurol Sci* 29 Suppl 5: S371-4.

Ariano, M. A., Engber, T. M., Susel, Z. and Chase, T. N. (1991) "Striatal D1 dopamine receptor morphochemistry following continuous or intermittent L-dopa replacement therapy", *Exp Neurol* 112: 112-8.

Aubert, I., Guigoni, C., Hakansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B. H., Gross, C. E., Fisone, G., Bloch, B. and Bezard, E. (2005) "Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia", *Ann Neurol* 57: 17-26.

Baas, H., Beiske, A. G., Ghika, J., Jackson, M., Oertel, W. H., Poewe, W. and Ransmayr, G. (1997) "Catechol-O-methyltransferase inhibition with tolcapone reduces the "wearing off" phenomenon and levodopa requirements in fluctuating parkinsonian patients", *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 421-8.

Ball, J. (2001) "Current advances in Parkinson's disease", *Trends Neurosci* 24: 367-9.

Banke, T. G., Bowie, D., Lee, H., Huganir, R. L., Schousboe, A. and Traynelis, S. F. (2000) "Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase", *J Neurosci* 20: 89-102.

Bar-Am, O., Weinreb, O., Amit, T. and Youdim, M. B. (2009) "The novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor and antioxidant, ladostigil, confers neuroprotection in neuroblastoma cells and aged rats", *J Mol Neurosci* 37: 135-45.

Baron, M. S., Vitek, J. L., Bakay, R. A., Green, J., Kaneoke, Y., Hashimoto, T., Turner, R. S., Woodard, J. L., Cole, S. A., McDonald, W. M. and DeLong, M. R. (1996) "Treatment of advanced Parkinson's disease by posterior GPi pallidotomy: 1-year results of a pilot study", *Ann Neurol* 40: 355-66.

Baron, M. S., Vitek, J. L., Bakay, R. A., Green, J., McDonald, W. M., Cole, S. A. and DeLong, M. R. (2000) "Treatment of advanced Parkinson's disease by unilateral posterior GPi pallidotomy: 4-year results of a pilot study", *Mov Disord* 15: 230-7.

Bartels, A. L. and Leenders, K. L. (2009) "Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology", *Cortex* 45: 915-21.

Baudier, J., Lee, S. H. and Cole, R. D. (1987) "Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II

phosphorylation by Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase C", *J Biol Chem* 262: 17584-90.

Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H. and Mandelkow, E. (1993) "Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5", *FEBS Lett* 336: 417-24.

Beal, M.F. (1998) "Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis", *Ann Neurol*. 1998 44(3 Suppl 1):S110-4.

Bear, M., Connors, B and Paradiso, M (1999) "Neurosciences à la découverte du cerveau", Éditions Pradel France. 33-34.

Bedard, P. J., Blanchet, P. J., Levesque, D., Soghomonian, J. J., Grondin, R., Morissette, M., Goulet, M., Calon, F., Falardeau, P., Gomez-Mancilla, B., Doucet, J. P., Robertson, G. S. and DiPaolo, T. (1999) "Pathophysiology of L-dopa-induced dyskinesias", *Mov Disord* 14 Suppl 1: 4-8.

Berke, J. D., Paletzki, R. F., Aronson, G. J., Hyman, S. E. and Gerfen, C. R. (1998) "A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation", *J Neurosci* 18: 5301-10.

Betarbet, R., Canet-Aviles, R. M., Sherer, T. B., Mastroberardino, P. G., McLendon, C., Kim, J. H., Lund, S., Na, H. M., Taylor, G., Bence, N. F., Kopito, R., Seo, B. B., Yagi, T., Yagi, A., Klinefelter, G., Cookson, M. R. and Greenamyre, J. T. (2006) "Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system", *Neurobiol Dis* 22: 404-20.

Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V. and Greenamyre, J. T. (2000) "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease", *Nat Neurosci* 3: 1301-6.

Bezard, E., Brotchie, J. M. and Gross, C. E. (2001) "Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies", *Nat Rev Neurosci* 2: 577-88.

Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R. N., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Pack, A., Wang, K. K. and Walker, L. C. (2002) "Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice", *J Comp Neurol* 446: 257-66.

Bibb, J. A., Chen, J., Taylor, J. R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G. L., Yan, Z., Sagawa, Z. K., Ouimet, C. C., Nairn, A. C., Nestler, E. J. and Greengard, P. (2001a) "Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5", *Nature* 410: 376-80.

- Bibb, J. A., Nishi, A., O'Callaghan, J. P., Ule, J., Lan, M., Snyder, G. L., Horiuchi, A., Saito, T., Hisanaga, S., Czernik, A. J., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2001b) "Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5", *J Biol Chem* 276: 14490-7.
- Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J., Huganir, R. L., Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. and Greengard, P. (1999) "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons", *Nature* 402: 669-71.
- Birkmayer, W. and Hornykiewicz, O. (1961) "[The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia.]", *Wien Klin Wochenschr* 73: 787-8.
- Blanchet, P. J. (2003) "Antipsychotic drug-induced movement disorders", *Can J Neurol Sci* 30 Suppl 1: S101-7.
- Blanchet, P. J., Grondin, R., Bedard, P. J., Shiosaki, K. and Britton, D. R. (1996) "Dopamine D1 receptor desensitization profile in MPTP-lesioned primates", *Eur J Pharmacol* 309: 13-20.
- Borghi, R., Giliberto, L., Assini, A., Delacourte, A., Perry, G., Smith, M. A., Strocchi, P., Zaccheo, D. and Tabaton, M. (2002) "Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy", *Neurology* 58: 589-92.
- Bournival, J., Quessy, P. and Martinoli, M.G. (2009) "Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺ -induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons", *Cell Mol Neurobiol* 29(8):1169-80.
- Bove, J., Zhou, C., Jackson-Lewis, V., Taylor, J., Chu, Y., Rideout, H. J., Wu, D. C., Kordower, J. H., Petrucelli, L. and Przedborski, S. (2006) "Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling", *Ann Neurol* 60: 260-4.
- Bozzi Y. and Borrelli, E. (2006) "Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it?", *Trends Neurosci* 29(3):167-74.
- Brandt, R., Leger, J. and Lee, G. (1995) "Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain", *J Cell Biol* 131: 1327-40.
- Braak, H. and Braak, E. (1995) "Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes", *Neurobiol Aging* 16:271-278.
- Braak, H., Ru"b, U., Jansen Steur, E.N., Del Tredici, K. and de Vos R.A. (2005) "Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease", *Neurology* 64:1404–1410.

Brown, W. D., Taylor, M. D., Roberts, A. D., Oakes, T. R., Schueller, M. J., Holden, J. E., Malischke, L. M., DeJesus, O. T. and Nickles, R. J. (1999) "FluoroDOPA PET shows the nondopaminergic as well as dopaminergic destinations of levodopa", *Neurology* 53: 1212-8.

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. and Hof, P. R. (2000) "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders", *Brain Res Brain Res Rev* 33: 95-130.

Calabresi, P., Giacomini, P., Centonze, D. and Bernardi, G. (2000a) "Levodopa-induced dyskinesia: a pathological form of striatal synaptic plasticity?", *Ann Neurol* 47: S60-8; discussion S68-9.

Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, A. A. and Greengard, P. (2000b) "Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity", *J Neurosci* 20: 8443-51.

Calon, F., Grondin, R., Morissette, M., Goulet, M., Blanchet, P. J., Di Paolo, T. and Bedard, P. J. (2000) "Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias", *Ann Neurol* 47: S70-8.

Calon, F., Morissette, M., Rajput, A. H., Hornykiewicz, O., Bedard, P. J. and Di Paolo, T. (2003) "Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications", *Mov Disord* 18: 241-53.

Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T. and Waldeck, B. (1958) "On the presence of 3-hydroxytyramine in brain", *Science* 127: 471.

Castellanos, F. X. and Tannock, R. (2002) "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes", *Nat Rev Neurosci* 3: 617-28.

Causeret, F., Jacobs, T., Terao, M., Heath, O., Hoshino, M. and Nikolic, M. (2007) "Neurabin-I is phosphorylated by Cdk5: implications for neuronal morphogenesis and cortical migration", *Mol Biol Cell* 18: 4327-42.

Cedarbaum, J. M. (1987) "Clinical pharmacokinetics of anti-parkinsonian drugs", *Clin Pharmacokinet* 13: 141-78.

Cenci, M. A. (2002) "Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease", *Amino Acids* 23: 105-9.

Cenci, M.A., Whishaw, I.Q. and Schallert, T. (2002) "Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? ", *Nat Rev Neurosci* 3(7):574-9.

Cenci, M.A. and Lundblad, M. (2006) "Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia", *J Neurochem* 99(2):381-92.

Cenci, M. A. (2007) "Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA induced dyskinesia", *Trends Neurosci* 30: 236-43.

Cenci, M. A., Lee, C. S. and Bjorklund, A. (1998) "L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA", *Eur J Neurosci* 10: 2694-706.

Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., Bernardi, G. and Calabresi, P. (2001) "Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum", *Eur J Neurosci* 13: 1071-7.

Cepeda, C., Colwell, C. S., Itri, J. N., Chandler, S. H. and Levine, M. S. (1998) "Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances", *J Neurophysiol* 79: 82-94.

Chan, A. S., Ng, L. W., Poon, L. S., Chan, W. W. and Wong, Y. H. (2007) "Dopaminergic and adrenergic toxicities on SK-N-MC human neuroblastoma cells are mediated through G protein signaling and oxidative stress", *Apoptosis* 12: 167-79.

Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E. and Surmeier, D.J. (2007) "'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease", *Nature*. 447(7148):1081-6.

Chan, C.S., Gertler, T.S., Surmeier, D.J. (2009) "Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease.", *Trends Neurosci*. 32(5):249-56.

Charcot J-M. (1890) " Wirkungen des Blitzschlages auf das Nervensystem". *Wien Med Wochenschr*. 40:104-106.

Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borrelli, E. and Caboche, J. (2005) "Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation", *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12218-23.

Chase, T. N. (1998) "Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine", *Neurology* 50: S17-25.

Chase, T. N., Mouradian, M. M. and Engber, T. M. (1993) "Motor response complications and the function of striatal efferent systems", *Neurology* 43: S23-7.

Chase, T. N. and Oh, J. D. (2000) "Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications", *Ann Neurol* 47: S122-9; discussion S129-30.

Chaudhuri, K. R. and Schapira, A. H. (2009) "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment", *Lancet Neurol* 8: 464-74.

Chen, J., Rusnak, M., Lombroso, P. J. and Sidhu, A. (2009) "Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades", *Eur J Neurosci* 29: 287-306.

Chen, J., Rusnak, M., Luedtke, R. R. and Sidhu, A. (2004) "D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade", *J Biol Chem* 279: 39317-30.

Chen, J. and Sidhu, A. (2005) "The role of D1 dopamine receptors and phospho-ERK in mediating cytotoxicity. Commentary", *Neurotox Res* 7: 179-81.

Chen, J., Wersinger, C. and Sidhu, A. (2003) "Chronic stimulation of D1 dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastoma cells induces nitric-oxide synthase activation and cytotoxicity", *J Biol Chem* 278: 28089-100.

Cho, J. H. and Johnson, G. V. (2003) "Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding", *J Biol Chem* 278: 187-93.

Cicchetti, F., Brownell, A. L., Williams, K., Chen, Y. I., Livni, E. and Isacson, O. (2002) "Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging", *Eur J Neurosci* 15: 991-8.

Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J. and Gross, R. E. (2009) "Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?", *Trends Pharmacol Sci* 30: 475-83.

Ciliax, B. J., Nash, N., Heilman, C., Sunahara, R., Hartney, A., Tiberi, M., Rye, D. B., Caron, M. G., Niznik, H. B. and Levey, A. I. (2000) "Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain", *Synapse* 37: 125-45.

Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977) "Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin", *J Mol Biol* 116: 207-25.

Cole, R. L., Konradi, C., Douglass, J. and Hyman, S. E. (1995) "Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum", *Neuron* 14: 813-23.

Compta, Y., Martí, M.J., Ibarretxe-Bilbao, N., Junqué, C., Valldeoriola, F., Muñoz, E., Ezquerro, M., Ríos, J. and Tolosa, E. (2009) "Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease", *Mov Disord.* 24(15):2203-10

Coronas, V., Feron, F., Hen, R., Sicard, G., Jourdan, F. and Moyse, E. (1997) "In vitro induction of apoptosis or differentiation by dopamine in an immortalized olfactory neuronal cell line", *J Neurochem* 69: 1870-81.

Corvol, J. C., Muriel, M. P., Valjent, E., Feger, J., Hanoun, N., Girault, J. A., Hirsch, E. C. and Herve, D. (2004) "Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease", *J Neurosci* 24: 7007-14.

Crocker, S. J., Smith, P. D., Jackson-Lewis, V., Lamba, W. R., Hayley, S. P., Grimm, E., Callaghan, S. M., Slack, R. S., Melloni, E., Przedborski, S., Robertson, G. S., Anisman, H., Merali, Z. and Park, D. S. (2003) "Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease", *J Neurosci* 23: 4081-91.

Cruz, J. C. and Tsai, L. H. (2004) "Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Trends Mol Med* 10: 452-8.

Cyr, M., Beaulieu, J. M., Laakso, A., Sotnikova, T. D., Yao, W. D., Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R. and Caron, M. G. (2003) "Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons", *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11035-40.

Cyr, M., Caron, M. G., Johnson, G. A. and Laakso, A. (2005) "Magnetic resonance imaging at microscopic resolution reveals subtle morphological changes in a mouse model of dopaminergic hyperfunction", *Neuroimage* 26: 83-90.

Da Silva-Junior, F. P., Braga-Neto, P., Sueli Monte, F. and de Bruin, V. M. (2005) "Amantadine reduces the duration of levodopa-induced dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study", *Parkinsonism Relat Disord* 11: 449-52.

Dawson, T. M., Gehlert, D. R., McCabe, R. T., Barnett, A. and Wamsley, J. K. (1986) "D-1 dopamine receptors in the rat brain: a quantitative autoradiographic analysis", *J Neurosci* 6: 2352-65.

Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., Mugnaini, E., Deutch, A.Y., Sesack, S.R., Arbuthnott, G.W. and Surmeier, D.J. (2006) "Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models", *Nat Neurosci.* 9(2):251-9.

Dayanandan, R., Van Slegtenhorst, M., Mack, T. G., Ko, L., Yen, S. H., Leroy, K., Brion, J. P., Anderton, B. H., Hutton, M. and Lovestone, S. (1999) "Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation", *FEBS Lett* 446: 228-32.

De Keyser, J., Claeys, A., De Backer, J. P., Ebinger, G., Roels, F. and Vauquelin, G. (1988) "Autoradiographic localization of D1 and D2 dopamine receptors in the human brain", *Neurosci Lett* 91: 142-7.

Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W. and Cenci, M.A. (2007) "Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model", *Behav Brain Res* 179(1):76-89.

De Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A. and Bos, J. L. (1998) "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP", *Nature* 396: 474-7.

Defebvre, L. D., k (2007) "Neuropsychologie de la maladie de Parkinson et des syndrômes apparentés.", Elsevier Masson, Cedex 1-89.

Dekundy, A., Pietraszek, M., Schaefer, D., Cenci, M. A. and Danysz, W. (2006) "Effects of group I metabotropic glutamate receptors blockade in experimental models of Parkinson's disease", *Brain Res Bull* 69: 318-26.

Del Dotto, P., Pavese, N., Gambaccini, G., Bernardini, S., Metman, L. V., Chase, T. N. and Bonuccelli, U. (2001) "Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study", *Mov Disord* 16: 515-20.

Deleu, D., Northway, M. G. and Hanssens, Y. (2002) "Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease", *Clin Pharmacokinet* 41: 261-309.

Deumens, R., Blokland, A. and Prickaerts, J. (2002) "Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway", *Exp Neurol* 175: 303-17.

Dhavan, R. and Tsai, L. H. (2001) "A decade of CDK5", *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 749-59.

- Di Monte, D. A. (2003) "The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?", *Lancet Neurol* 2: 531-8.
- Doucet, J. P., Nakabeppu, Y., Bedard, P. J., Hope, B. T., Nestler, E. J., Jasmin, B. J., Chen, J. S., Iadarola, M. J., St-Jean, M., Wigle, N., Blanchet, P., Grondin, R. and Robertson, G. S. (1996) "Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum", *Eur J Neurosci* 8: 365-81.
- Dugan, L. L., Kim, J. S., Zhang, Y., Bart, R. D., Sun, Y., Holtzman, D. M. and Gutmann, D. H. (1999) "Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf", *J Biol Chem* 274: 25842-8.
- Ehringer, H. and Hornykiewicz, O. (1960) "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]", *Klin Wochenschr* 38: 1236-9.
- Encarnacion, E. V. and Hauser, R. A. (2008) "Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: etiology, impact on quality of life, and treatments", *Eur Neurol* 60: 57-66.
- Faull, R. L. and Lavery, R. (1969) "Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra", *Exp Neurol* 23: 332-40.
- Fearnley, J. M. and Lees, A. J. (1990) "Striatonigral degeneration. A clinicopathological study", *Brain* 113 (Pt 6): 1823-42.
- Feijoo, C., Campbell, D. G., Jakes, R., Goedert, M. and Cuenda, A. (2005) "Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly", *J Cell Sci* 118: 397-408.
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M. and Missale, C. (2003) "Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors", *J Biol Chem* 278: 20196-202.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Pang, P. T., Lu, B. and Tsai, L. H. (2005) "Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory", *Neuron* 48: 825-38.
- Fisone, G., Hakansson, K., Borgkvist, A. and Santini, E. (2007) "Signaling in the basal ganglia: postsynaptic and presynaptic mechanisms", *Physiol Behav* 92: 8-14.

Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P. and Levine, M. S. (2002) "Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32", *J Neurophysiol* 88: 3010-20.

Fornai, F., Schluter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A. and Sudhof, T. C. (2005) "Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein", *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3413-8.

Fu, W. Y., Chen, Y., Sahin, M., Zhao, X. S., Shi, L., Bikoff, J. B., Lai, K. O., Yung, W. H., Fu, A. K., Greenberg, M. E. and Ip, N. Y. (2007) "Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism", *Nat Neurosci* 10: 67-76.

Fulga, T.A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M.L., Spires, T.L., Hyman, B.T. and Feany MB (2007) "Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo", *Nat Cell Biol* 9:139-148.

Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S. and Obata, F. (2005) "An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family", *Ann Neurol* 57: 918-21.

Futter, M., Uematsu, K., Bullock, S. A., Kim, Y., Hemmings, H. C., Jr., Nishi, A., Greengard, P. and Nairn, A. C. (2005) "Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5)", *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3489-94.

Gagnon, J. F., Postuma, R. B., Mazza, S., Doyon, J. and Montplaisir, J. (2006) "Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases", *Lancet Neurol* 5: 424-32.

Gainetdinov, R. R., Jones, S. R., Fumagalli, F., Wightman, R. M. and Caron, M. G. (1998) "Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis", *Brain Res Brain Res Rev* 26: 148-53.

Gainetdinov, R. R., Wetsel, W. C., Jones, S. R., Levin, E. D., Jaber, M. and Caron, M. G. (1999) "Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity", *Science* 283: 397-401.

Gasser, T. (1998) "Genetics of Parkinson's disease", *Ann Neurol* 44: S53-7.

Gelb, D. J., Oliver, E. and Gilman, S. (1999) "Diagnostic criteria for Parkinson disease", *Arch Neurol* 56: 33-9.

Gendron, T. F. and Petrucelli, L. (2009) "The role of tau in neurodegeneration", *Mol Neurodegener* 4: 13.

Gerfen, C. R., Keefe, K. A. and Gauda, E. B. (1995) "D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons", *J Neurosci* 15: 8167-76.

Gerfen, C. R., Miyachi, S., Paletzki, R. and Brown, P. (2002) "D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase", *J Neurosci* 22: 5042-54.

Gerhardt, G. A., Cass, W. A., Hudson, J., Henson, M., Zhang, Z., Ovadia, A., Hoffer, B. J. and Gash, D. M. (1996) "In vivo electrochemical studies of dopamine overflow and clearance in the striatum of normal and MPTP-treated rhesus monkeys", *J Neurochem* 66: 579-88.

Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H. and Youdim, M. B. (1991) "MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease", *Eur J Pharmacol* 208: 273-86.

Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M. and Caron, M. G. (1996) "Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter", *Nature* 379: 606-12.

Gjerstad, M. D., Wentzel-Larsen, T., Aarsland, D. and Larsen, J. P. (2007) "Insomnia in Parkinson's disease: frequency and progression over time", *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 476-9.

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. and Crowther, R. A. (1989) "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease", *Neuron* 3: 519-26.

Goedert, M. (1996) "Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease", *Ann N Y Acad Sci* 777: 121-31.

Goedert, M., Jakes, R. and Crowther, R. A. (1999) "Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments", *FEBS Lett* 450: 306-11.

Golbe, L. I. (1991) "Young-onset Parkinson's disease: a clinical review", *Neurology* 41: 168-73.

Goulet, M., Grondin, R., Blanchet, P. J., Bedard, P. J. and Di Paolo, T. (1996) "Dyskinesias and tolerance induced by chronic treatment with a D1 agonist administered in pulsatile or continuous mode do not correlate with changes of putaminal D1 receptors in drug-naive MPTP monkeys", *Brain Res* 719: 129-37.

Grace, A. A. (2008) "Physiology of the normal and dopamine-depleted basal ganglia: insights into levodopa pharmacotherapy", *Mov Disord* 23 Suppl 3: S560-9.

Greengard, P. (2001) "The neurobiology of slow synaptic transmission", *Science* 294: 1024-30.

Greengard, P., Nairn, A. C., Girault, J. A., Ouimet, C. C., Snyder, G. L., Fisone, G., Allen, P. B., Fienberg, A. and Nishi, A. (1998) "The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration", *Brain Res Brain Res Rev* 26: 274-84.

Groenewegen, H. J. (2003) "The basal ganglia and motor control", *Neural Plast* 10: 107-20.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. and Binder, L. I. (1986) "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology", *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4913-7.

Gunn, J., Hamilton, M. M. and Boyle, R. M. (1989) "Hypertensive crisis and broad complex bradycardia after a single dose of monoamine oxidase inhibitor", *Bmj* 298: 964.

Hallett, P.J. and Standaert, D.G. (2004) "Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease", *Pharmacol Ther* 102:155-174.

Hallett, P. J., Spoelgen, R., Hyman, B. T., Standaert, D. G. and Dunah, A. W. (2006) "Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking", *J Neurosci* 26: 4690-700.

Hanger, D. P., Anderton, B. H. and Noble, W. (2009) "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease", *Trends Mol Med* 15: 112-9.

Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K. Y., Saxton, M. J., Seereeram, A., Reynolds, C. H., Ward, M. A. and Anderton, B. H. (2007) "Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis", *J Biol Chem* 282: 23645-54.

Hartigan, J. A. and Johnson, G. V. (1999) "Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 β -dependent pathway", *J Biol Chem* 274: 21395-401.

Hasegawa, M., Smith, M. J. and Goedert, M. (1998) "Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly", *FEBS Lett* 437: 207-10.

Hauser RA, Zesiewicz TA. (2007) "Advances in the pharmacologic management of early Parkinson disease", *Neurologist* 13(3):126-32.

Hauser, R. A. (2009) "Levodopa: past, present, and future", *Eur Neurol* 62: 1-8.
Heikkila, R. E., Sieber, B. A., Manzino, L. and Sonsalla, P. K. (1989) "Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse", *Mol Chem Neuropathol* 10: 171-83.

Hely, M. A., Morris, J. G., Reid, W. G. and Trafficante, R. (2005) "Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years", *Mov Disord* 20: 190-9.

Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P., Tung, H. Y. and Cohen, P. (1984) "DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1", *Nature* 310: 503-5.

Herting, B., Bietenbeck, S., Scholz, K., Hahner, A., Hummel, T. and Reichmann, H. (2008) "[Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: its role as a new cardinal sign in early and differential diagnosis]", *Nervenarzt* 79: 175-84.

Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H. and Surmeier, D.J. (2000) "D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade", *J Neurosci.* 20(24):8987-95.

Herve, D., Levi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J. P., Glowinski, J. and Girault, J. A. (1993) "G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase", *J Neurosci* 13: 2237-48.

Hirokawa, N., Shiomura, Y. and Okabe, S. (1988) "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules", *J Cell Biol* 107: 1449-59.

Hirsch, E. C., Hunot, S. and Hartmann, A. (2005) "Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease", *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1: S9-S15.

Hirsch, E. C., Perier, C., Orioux, G., Francois, C., Feger, J., Yelnik, J., Vila, M., Levy, R., Tolosa, E. S., Marin, C., Trinidad Herrero, M., Obeso, J. A. and Agid, Y. (2000) "Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia", *Trends Neurosci* 23: S78-85.

Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R. and Zalutsky, R. (2007) "How common are the "common" neurologic disorders?", *Neurology* 68: 326-37.

Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J. C., Wilhelmsen, K. C., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1998) "Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17", *Science* 282: 1914-7.

Hornykiewicz, O. (1973) "Parkinson's disease: from brain homogenate to treatment", *Fed Proc* 32: 183-90.

Hornykiewicz, O. (1998) "Biochemical aspects of Parkinson's disease", *Neurology* 51: S2-9.

Hughes, A. J., Daniel, S. E., Blankson, S. and Lees, A. J. (1993) "A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease", *Arch Neurol* 50: 140-8.

Hurley, M. J. and Jenner, P. (2006) "What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease?", *Pharmacol Ther* 111: 715-28.

Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R. and Ogawara, M. (1986) "Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease", *J Biochem* 99: 1807-10.

Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (2008) "Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention", *J Cell Mol Med* 12(1):38-55.

Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C. and Caron, M. G. (1996) "Dopamine receptors and brain function", *Neuropharmacology* 35: 1503-19.

Jackson, D. M. and Westlind-Danielsson, A. (1994) "Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects", *Pharmacol Ther* 64: 291-370.

Jackson, M. J., Smith, L. A., Al-Barghouthy, G., Rose, S. and Jenner, P. (2007) "Decreased expression of l-dopa-induced dyskinesia by switching to ropinirole in MPTP-treated common marmosets", *Exp Neurol* 204: 162-70.

Jacomy, H., Zhu, Q., Couillard-Despres, S., Beaulieu, J. M. and Julien, J. P. (1999) "Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits", *J Neurochem* 73: 972-84.

- Jakel, R. J. and Maragos, W. F. (2000) "Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine", *Trends Neurosci* 23: 239-45.
- Jankovic, J. (2002) "Levodopa strengths and weaknesses", *Neurology* 58: S19-32.
- Jellinger, K. A. (1991) "Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway", *Mol Chem Neuropathol* 14: 153-97.
- Jenner, P. and Olanow, C. W. (1996) "Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease", *Neurology* 47: S161-70.
- Jenner, P. (2003) "Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease", *Curr Opin Neurol* 16 Suppl 1: S3-7.
- Jenner, P. (2008) "Molecular mechanism of L-DOPA-induced dyskinesias", *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (9): 665-77.
- Jicha, G. A., Weaver, C., Lane, E., Vianna, C., Kress, Y., Rockwood, J. and Davies, P. (1999) "cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease", *J Neurosci* 19: 7486-94.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R. M. and Caron, M. G. (1998) "Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter", *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4029-34.
- Jope, R. S. and Johnson, G. V. (2004) "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3", *Trends Biochem Sci* 29: 95-102.
- Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M. and Pearce R.K. (2008) "Striatal beta-amyloid deposition in Parkinson disease with dementia", *J Neuropathol Exp Neurol* 67:155–161
- Kaye, J. A. and Feldman, R. G. (1986) "The role of L-dopa holiday in the long-term management of Parkinson's disease", *Clin Neuropharmacol* 9: 1-13.
- Khan, Z. U., Gutierrez, A., Martin, R., Penafiel, A., Rivera, A. and de la Calle, A. (2000) "Dopamine D5 receptors of rat and human brain", *Neuroscience* 100: 689-99.
- Kim, Y., Sung, J. Y., Ceglia, I., Lee, K. W., Ahn, J. H., Halford, J. M., Kim, A. M., Kwak, S. P., Park, J. B., Ho Ryu, S., Schenck, A., Bardoni, B., Scott, J. D., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2006) "Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology", *Nature* 442: 814-7.

Kish, S. J., Shannak, K. and Hornykiewicz, O. (1988) "Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications", *N Engl J Med* 318: 876-80.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N. (1998) "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism", *Nature* 392: 605-8.

Kluger, B.M., Klepitskaya, O. and Okun, M.S. (2009) "Surgical treatment of movement disorders." *Neurol Clin.* 27(3):633-77.

Koller, W. C., Hutton, J. T., Tolosa, E. and Capilldeo, R. (1999) "Immediate-release and controlled-release carbidopa/levodopa in PD: a 5-year randomized multicenter study. Carbidopa/Levodopa Study Group", *Neurology* 53: 1012-9.

Konradi, C., Westin, J.E., Carta, M., Eaton, M.E., Kuter, K., Dekundy, A., Lundblad, M. and Cenci MA. (2004) "Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia", *Neurobiol Dis.* 2004 17(2):219-36.

Korczyn, A. D., Brooks, D. J., Brunt, E. R., Poewe, W. H., Rascol, O. and Stocchi, F. (1998) "Ropinirole versus bromocriptine in the treatment of early Parkinson's disease: a 6-month interim report of a 3-year study. 053 Study Group", *Mov Disord* 13: 46-51.

Kordower, J. H., Kanaan, N. M., Chu, Y., Suresh Babu, R., Stansell, J., 3rd, Terpstra, B. T., Sortwell, C. E., Steece-Collier, K. and Collier, T. J. (2006) "Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys", *Ann Neurol* 60: 264-8.

Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S. and Neve, R. L. (1989) "Developmentally regulated expression of specific tau sequences", *Neuron* 2: 1389-97.

Lai, B. C., Schulzer, M., Marion, S., Teschke, K. and Tsui, J. K. (2003) "The prevalence of Parkinson's disease in British Columbia, Canada, estimated by using drug tracer methodology", *Parkinsonism Relat Disord* 9: 233-8.

Landwehrmeyer, B., Mengod, G. and Palacios, J. M. (1993) "Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain", *Brain Res Mol Brain Res* 18: 187-92.

Lang, F., Foller, M., Lang, K. S., Lang, P. A., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A. and Huber, S. M. (2005) "Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death", *J Membr Biol* 205: 147-57.

Langston, J. W., Forno, L. S., Tetud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A. and Karluk, D. (1999) "Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia

nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure", *Ann Neurol* 46: 598-605.

Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M. G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C. and Cicchetti, F. (2004) "Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity", *Faseb J* 18: 717-9.

Larivière, M.C. and Julien J.P., (2004) "Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease", *J Neurobiol.* 58(1):131-48.

Lau, C. G. and Zukin, R. S. (2007) "NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders", *Nat Rev Neurosci* 8: 413-26.

LaVoie, M. J. and Hastings, T. G. (1999) "Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine", *J Neurosci* 19: 1484-91.

Lebel, M. Robinson, P. and Cyr, M. (2007) "Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases", *Can J Neurol Sci.* 34(1):18-29.

Lebel, M., Patenaude, C., Allyson, J., Massicotte, G. and Cyr, M. (2009) "Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways", *Neuropharmacology* 57: 392-402.

Lebel, M., Chagniel, L., Bureau, G. and Cyr, M. (2010) "Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat", *Neurobiology of Disease* 38 (1): 59-67).

Lebel, M and Cyr, M. (2010) "Molecular and Cellular Events of Dopamine D1 Receptor-Mediated Tau Phosphorylation in SK-N-MC cells", *Synapse*. In press.

Lee, C. S., Sauer, H. and Bjorklund, A. (1996) "Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat", *Neuroscience* 72: 641-53.

Lee, F. J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chery, N., Wang, Y., Wang, Y. T., Niznik, H. B., Yu, X. M. and Liu, F. (2002) "Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor", *Cell* 111: 219-30.

Lee, K. S., Seo, S. H., Lee, Y. H., Kim, H. D., Son, M. H., Chung, B. Y., Lee, J. Y., Jin, C. and Lee, Y. S. (2005) "Synthesis and biological evaluation of chromone carboxamides as calpain inhibitors", *Bioorg Med Chem Lett* 15: 2857-60.

Lee, K. W., Kim, Y., Kim, A. M., Helmin, K., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2006) "Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens", *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3399-404.

Lee, M. K., Xu, Z., Wong, P. C. and Cleveland, D. W. (1993) "Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo", *J Cell Biol* 122: 1337-50.

Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M. and Tsai, L. H. (2000) "Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain", *Nature* 405: 360-4.

Lees, A. (2005) "Alternatives to levodopa in the initial treatment of early Parkinson's disease", *Drugs Aging* 22: 731-40.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D. and Polymeropoulos, M. H. (1998) "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease", *Nature* 395: 451-2.

Levesque, D., Diaz, J., Pilon, C., Martres, M. P., Giros, B., Souil, E., Schott, D., Morgat, J. L., Schwartz, J. C. and Sokoloff, P. (1992) "Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin", *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8155-9.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. and McGowan, E. (2001) "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP" *Science* 293(5534):1487-91.

Lewis, S. J., Dove, A., Robbins, T. W., Barker, R. A. and Owen, A. M. (2003) "Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry", *J Neurosci* 23: 6351-6.

Lewis, S. J. and Barker, R. A. (2009) "Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: insights into disease heterogeneity", *J Clin Neurosci* 16: 620-5.

Li, Y., Kolb, B. and Robinson, T. E. (2003) "The location of persistent amphetamine-induced changes in the density of dendritic spines on medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen", *Neuropsychopharmacology* 28: 1082-5.

Lindgren, H. S., Rylander, D., Ohlin, K. E., Lundblad, M. and Cenci, M. A. (2007) "The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated

chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration", *Behav Brain Res* 177: 150-9.

Liu Q., Xie F., Siedlak S.L., Nunomura A., Honda K., Moreira P.I., Zhua X., Smith M.A. and Perry G., (2004) "Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases" *Cell Mol Life Sci.* 61(24):3057-75.

Liu, S. J., Zhang, J. Y., Li, H. L., Fang, Z. Y., Wang, Q., Deng, H. M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Wang, J. Z. (2004) "Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain", *J Biol Chem* 279: 50078-88.

Lopez, A., Munoz, A., Guerra, M. J. and Labandeira-Garcia, J. L. (2001) "Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum", *Neuroscience* 103: 639-51.

Lozano, A. M., Lang, A. E., Levy, R., Hutchison, W. and Dostrovsky, J. (2000) "Neuronal recordings in Parkinson's disease patients with dyskinesias induced by apomorphine", *Ann Neurol* 47: S141-6.

Lucking, C. B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N. W., Agid, Y. and Brice, A. (2000) "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene", *N Engl J Med* 342: 1560-7.

Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N. and Cenci, M.A. (2002) "Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease", *Eur J Neurosci.* 15(1):120-32.

Lundblad, M., Vaudano, E. and Cenci, M. A. (2003) "Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia", *J Neurochem* 84: 1398-410.

Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. and Roth, G. S. (1998) "Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway", *J Biol Chem* 273: 3756-64.

Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R. and Mandelkow, E. (1992) "Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau", *FEBS Lett* 314: 315-21.

Mandelkow, E. M., Thies, E., Trinczek, B., Biernat, J. and Mandelkow, E. (2004) "MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons", *J Cell Biol* 167: 99-110.

Mangiavacchi, S. and Wolf, M. E. (2004) "D1 dopamine receptor stimulation increases the rate of AMPA receptor insertion onto the surface of cultured nucleus accumbens neurons through a pathway dependent on protein kinase A", *J Neurochem* 88: 1261-71.

Manning-Bog, A. B., Reaney, S. H., Chou, V. P., Johnston, L. C., McCormack, A. L., Johnston, J., Langston, J. W. and Di Monte, D. A. (2006) "Lack of nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition", *Ann Neurol* 60: 256-60.

Mannisto, P. T. and Kaakkola, S. (1989) "New selective COMT inhibitors: useful adjuncts for Parkinson's disease?", *Trends Pharmacol Sci* 10: 54-6.

Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. (1993) "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain", *Cell* 73: 381-93.

Marsden, C. D. (1982) "The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg Lecture", *Neurology* 32: 514-39.

Mattson, M.P. (2007) "Calcium and neurodegeneration", *Aging Cell* 6(3):337-50.

Mazanetz, M. P. and Fischer, P. M. (2007) "Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases", *Nat Rev Drug Discov* 6: 464-79.

McClung, C. A., Ulery, P. G., Perrotti, L. I., Zachariou, V., Berton, O. and Nestler, E. J. (2004) "DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain", *Brain Res Mol Brain Res* 132: 146-54.

McCormack, A. L. and Di Monte, D. A. (2003) "Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration", *J Neurochem* 85: 82-6.

McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2004) "Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease", *Parkinsonism Relat Disord* 10 Suppl 1: S3-7.

McNaught, K. S. and Olanow, C. W. (2003) "Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease", *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S73-84; discussion S84-6.

McNaught, K. S., Perl, D. P., Brownell, A. L. and Olanow, C. W. (2004) "Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease", *Ann Neurol* 56: 149-62.

Meredith, G. E. and Kang, U. J. (2006) "Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem", *Mov Disord* 21: 1595-606.

- Metman, L. V., Del Dotto, P., LePoole, K., Konitsiotis, S., Fang, J. and Chase, T. N. (1999) "Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study", *Arch Neurol* 56: 1383-6.
- Middleton, F. A. and Strick, P. L. (2000) "Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits", *Brain Res Brain Res Rev* 31: 236-50.
- Migheli, A., Butler, M., Brown, K. and Shelanski, M. L. (1988) "Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain", *J Neurosci* 8: 1846-51.
- Mishra, R. K., Gardner, E. L., Katzman, R. and Makman, M. H. (1974) "Enhancement of dopamine-stimulated adenylate cyclase activity in rat caudate after lesions in substantia nigra: evidence for denervation supersensitivity", *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 3883-7.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. and Caron, M. G. (1998) "Dopamine receptors: from structure to function", *Physiol Rev* 78: 189-225.
- Mollenhauer, B., Trenkwalder, C., von Ahsen, N., Bibl, M., Steinacker, P., Brechlin, P., Schindehuetten, J., Poser, S., Wiltfang, J. and Otto, M. (2006) "Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia", *Dement Geriatr Cogn Disord*. 22(3):200-8
- Montastruc, J. L., Rascol, O. and Rascol, A. (1990) "Comparison of bromocriptine and levodopa as first line treatment of Parkinson's disease: results of a 3-year prospective randomized study", *Rev Neurol (Paris)* 146: 144-7.
- Morabito, M. A., Sheng, M. and Tsai, L. H. (2004) "Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons", *J Neurosci* 24: 865-76.
- Moreno, F. J. and Avila, J. (1998) "Phosphorylation of stathmin modulates its function as a microtubule depolymerizing factor", *Mol Cell Biochem* 183: 201-9.
- Morin, N., Gregoire, L., Gomez-Mancilla, B., Gasparini, F. and Di Paolo, T. (2010) "Effect of the metabotropic glutamate receptor type 5 antagonists MPEP and MTEP in parkinsonian monkeys", *Neuropharmacology* 58(7):981-6.
- Mouradian, M. M., Heuser, I. J., Baronti, F. and Chase, T. N. (1990) "Modification of central dopaminergic mechanisms by continuous levodopa therapy for advanced Parkinson's disease", *Ann Neurol* 27: 18-23.
- Murray, A. M., Ryoo, H. L., Gurevich, E. and Joyce, J. N. (1994) "Localization of dopamine D3 receptors to mesolimbic and D2 receptors to mesostriatal regions of human forebrain", *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11271-5.

- Murray, A. M., Hyde, T. M., Knable, M. B., Herman, M. M., Bigelow, L. B., Carter, J. M., Weinberger, D. R. and Kleinman, J. E. (1995) "Distribution of putative D4 dopamine receptors in postmortem striatum from patients with schizophrenia", *J Neurosci* 15: 2186-91.
- Muthane, U. B., Swamy, H. S., Satishchandra, P., Subhash, M. N., Rao, S. and Subbakrishna, D. (1994) "Early onset Parkinson's disease: are juvenile- and young-onset different?", *Mov Disord* 9: 539-44.
- Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M. and Yen, S. H. (1999) "Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations", *FEBS Lett* 447: 195-9.
- Nestler, E. J., Kelz, M. B. and Chen, J. (1999) "DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity", *Brain Res* 835: 10-7.
- Neve, K. A., Seamans, J. K. and Trantham-Davidson, H. (2004) "Dopamine receptor signaling", *J Recept Signal Transduct Res* 24: 165-205.
- Nicholson, S.L. and Brotchie, J.M. (2002) "5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) and Parkinson's disease - opportunities for novel therapeutics to reduce the problems of levodopa therapy", *Eur J Neurol*. 9 Suppl 3:1-6.
- Nicklas, W. J., Saporito, M., Basma, A., Geller, H. M. and Heikkila, R. E. (1992) "Mitochondrial mechanisms of neurotoxicity", *Ann N Y Acad Sci* 648: 28-36.
- Nishi, A., Snyder, G. L. and Greengard, P. (1997) "Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine", *J Neurosci* 17: 8147-55.
- Nishi, A., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Higashi, H., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2000) "Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop", *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12840-5.
- Noble, F., Szucs, M., Kieffer, B. and Roques, B. P. (2000) "Overexpression of dynamin is induced by chronic stimulation of mu- but not delta-opioid receptors: relationships with mu-related morphine dependence", *Mol Pharmacol* 58: 159-66.
- Norrholm, S. D., Bibb, J. A., Nestler, E. J., Ouimet, C. C., Taylor, J. R. and Greengard, P. (2003) "Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5", *Neuroscience* 116: 19-22.
- Nutt, J. G. and Fellman, J. H. (1984) "Pharmacokinetics of levodopa", *Clin Neuropharmacol* 7: 35-49.

Nutt, J. G. and Holford, N. H. (1996) "The response to levodopa in Parkinson's disease: imposing pharmacological law and order", *Ann Neurol* 39: 561-73.

Nutt, J. G., Obeso, J. A. and Stocchi, F. (2000) "Continuous dopamine-receptor stimulation in advanced Parkinson's disease", *Trends Neurosci* 23: S109-15.

Nyholm, D., Askmark, H., Gomes-Trolin, C., Knutson, T., Lennernas, H., Nystrom, C. and Aquilonius, S. M. (2003) "Optimizing levodopa pharmacokinetics: intestinal infusion versus oral sustained-release tablets", *Clin Neuropharmacol* 26: 156-63.

Obeso, J. A., Olanow, C. W. and Nutt, J. G. (2000a) "Levodopa motor complications in Parkinson's disease", *Trends Neurosci* 23: S2-7.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., DeLong, M. R. and Olanow, C. W. (2000b) "Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model", *Ann Neurol* 47: S22-32; discussion S32-4.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C. and Rodriguez, M. (2008) "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease", *Mov Disord* 23 Suppl 3: S548-59.

Oertner, T.G. and Matus, A. (2005) "Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines", *Cell Calcium* 37(5):477-82.

Olanow, C. W. and Koller, W. C. (1998) "An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: treatment guidelines. American Academy of Neurology", *Neurology* 50: S1-57.

Olanow, C. W., Obeso, J. A. and Stocchi, F. (2006) "Drug insight: Continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease", *Nat Clin Pract Neurol* 2: 382-92.

Olanow, C.W., Stern, C.B. and Sethi, K. (2009) "The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease", *Neurology* 72(21 Suppl 4): S1-136.

Ouattara, B., Gregoire, L., Morissette, M., Gasparini, F., Vranesic, I., Bilbe, G., Johns, D.R., Rajput, A., Hornykiewicz, O., Rajput, A.H., Gomez-Mancilla, B. and Di Paolo, T. (2009) "Metabotropic glutamate receptor type 5 in levodopa-induced motor complications", *Neurobiol Aging*. Epub ahead of print.

Outeiro, T. F., Klucken, J., Bercury, K., Tetzlaff, J., Putcha, P., Oliveira, L. M., Quintas, A., McLean, P. J. and Hyman, B. T. (2009) "Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein", *PLoS One* 4: e6906.

Papa, S. M., Desimone, R., Fiorani, M. and Oldfield, E. H. (1999) "Internal globus pallidus discharge is nearly suppressed during levodopa-induced dyskinesias", *Ann Neurol* 46: 732-8.

Papa, S. M., Engber, T. M., Kask, A. M. and Chase, T. N. (1994) "Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration", *Brain Res* 662: 69-74.

Papasozomenos, S. C. and Binder, L. I. (1987) "Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system", *Cell Motil Cytoskeleton* 8: 210-26.

Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J. and Parks, J. K. (1989) "Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease", *Ann Neurol* 26: 719-23.

Parkinson, J. (1817) *"An essay on the Shaking Palsy"*, Sherwood, neely and Jones, London

Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H. (1999) "Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration", *Nature* 402: 615-22.

Paudel, H. K., Lew, J., Ali, Z. and Wang, J. H. (1993) "Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments", *J Biol Chem* 268: 23512-8.

Paul, S., Snyder, G. L., Yokakura, H., Picciotto, M. R., Nairn, A. C. and Lombroso, P. J. (2000) "The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway", *J Neurosci* 20: 5630-8.

Pavon, N., Martin, A. B., Mendiadua, A. and Moratalla, R. (2006) "ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice", *Biol Psychiatry* 59: 64-74.

Pei, L., Lee, F. J., Moszczynska, A., Vukusic, B. and Liu, F. (2004) "Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors", *J Neurosci* 24: 1149-58.

Pezzoli, G. and Zini, M., " Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future." *Expert Opin Pharmacother.* 2010 11(4):627-35.)

Picconi, B., Centonze, D., Hakansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M. A. and Calabresi, P. (2003) "Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia", *Nat Neurosci* 6: 501-6.

Picconi, B., Ghiglieri, V., Bagetta, V., Barone, I., Sgobio, C. and Calabresi P (2008) "Striatal synaptic changes in experimental parkinsonism: role of NMDA receptor trafficking in PSD", *Parkinsonism Relat Disord.* 14 Suppl 2:S145-9.

Pifl, C., Nanoff, C., Schingnitz, G., Schutz, W. and Hornykiewicz, O. (1992a) "Sensitization of dopamine-stimulated adenylyl cyclase in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys and patients with idiopathic Parkinson's disease", *J Neurochem* 58: 1997-2004.

Pifl, C., Reither, H. and Hornykiewicz, O. (1992b) "Functional sensitization of striatal dopamine D1 receptors in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat", *Brain Res* 572: 87-93.

Plattner, F., Angelo, M. and Giese, K. P. (2006) "The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation", *J Biol Chem* 281: 25457-65.

Poewe, W. and Wenning, G. K. (2000) "Apomorphine: an underutilized therapy for Parkinson's disease", *Mov Disord* 15: 789-94.

Pollak, P. (2004) "La maladie de Parkinson", Éditions Odile Jacob, Paris 29-67.
Polymeropoulos, M. H. (2000) "Genetics of Parkinson's disease", *Ann N Y Acad Sci* 920: 28-32.

Ponsen, M. M., Stoffers, D., Booij, J., van Eck-Smit, B. L., Wolters, E. and Berendse, H. W. (2004) "Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease", *Ann Neurol* 56: 173-81.

Porter, C. C., Totaro, J. A. and Stone, C. A. (1963) "Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice", *J Pharmacol Exp Ther* 140: 308-16.

Price, C. J., Kim, P. and Raymond, L. A. (1999) "D1 dopamine receptor-induced cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation and potentiation of striatal glutamate receptors", *J Neurochem* 73: 2441-6.

Primus, R. J., Thurkauf, A., Xu, J., Yevich, E., McInerney, S., Shaw, K., Tallman, J. F. and Gallagher, D. W. (1997) "II. Localization and characterization of dopamine D4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D4 receptor-selective ligand [3H]NGD 94-1", *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1020-7.

Przuntek, H., Muller, T. and Riederer, P. (2004) "Diagnostic staging of Parkinson's disease: conceptual aspects", *J Neural Transm* 111: 201-16.

Rajadhyaksha, A., Leveque, J., Macias, W., Barczak, A. and Konradi, C. (1998) "Molecular components of striatal plasticity: the various routes of cyclic AMP pathways", *Dev Neurosci* 20: 204-15.

Rajput, A. H. (1992) "Frequency and cause of Parkinson's disease", *Can J Neurol Sci* 19: 103-7.

Rascol, O. (1999) "Dopamine agonists: what is the place of the newer compounds in the treatment of Parkinson's disease?", *J Neural Transm Suppl* 55: 33-45.

Rascol, O. and Montastruc, J. L. (2000) "[Role of dopaminergic agonists]", *Rev Neurol (Paris)* 156 Suppl 2 Pt 2: 98-104.

Raven, P., Johnson, G, Losos, J and Singer, S (2007) "Biologie", de boeck Université, France 98-100.

Reynolds, D. S., Carter, R. J. and Morton, A. J. (1998) "Dopamine modulates the susceptibility of striatal neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease", *J Neurosci* 18: 10116-27.

Rinne, J. O., Portin, R., Ruottinen, H., Nurmi, E., Bergman, J., Haaparanta, M. and Solin, O. (2000) "Cognitive impairment and the brain dopaminergic system in Parkinson disease: [18F]fluorodopa positron emission tomographic study", *Arch Neurol* 57: 470-5.

Roberts, J. W., Cora-Locatelli, G., Bravi, D., Amantea, M. A., Mouradian, M. M. and Chase, T. N. (1993) "Catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone prolongs levodopa/carbidopa action in parkinsonian patients", *Neurology* 43: 2685-8.

Robertson, J., Loviny, T. L., Goedert, M., Jakes, R., Murray, K. J., Anderton, B. H. and Hanger, D. P. (1993) "Phosphorylation of tau by cyclic-AMP-dependent protein kinase", *Dementia* 4: 256-63.

Robertson, M. M. and Stern, J. S. (1997) "The Gilles de la Tourette syndrome", *Crit Rev Neurobiol* 11: 1-19.

Robinson, T. E. and Kolb, B. (1997) "Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine", *J Neurosci* 17: 8491-7.

Robinson, T. E. and Kolb, B. (1999) "Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine", *Eur J Neurosci* 11: 1598-604.

Robinson, T. E. and Kolb, B. (2004) "Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse", *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 33-46.

Rodrigues, R. W., Gomide, V. C. and Chadi, G. (2001) "Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine", *Int J Neurosci* 109: 91-126.

Rossi, G., Dalprà, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D. and Tagliavini F. (2008) "A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability", *Cell Cycle*. 7(12):1788-94.

Samadi, P., Gregoire, L., Morissette, M., Calon, F., Hadj Tahar, A., Dridi, M., Belanger, N., Meltzer, L.T., Bédard, P.J. and Di Paolo, T. (2008) "mGluR5 metabotropic glutamate receptors and dyskinesias in MPTP monkeys", *Neurobiol Aging* 29:1040-1051.

Sano, I., Gamo, T., Kakimoto, Y., Taniguchi, K., Takesada, M. and Nishinuma, K. (1959) "Distribution of catechol compounds in human brain", *Biochim Biophys Acta* 32: 586-7.

Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J. A., Herve, D., Greengard, P. and Fisone, G. (2007) "Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia", *J Neurosci* 27: 6995-7005.

Santini, E., Valjent, E. and Fisone, G. (2008) "Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction", *Febs J* 275: 1392-9.

Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E. and Fisone, G. (2009) "Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia", *Sci Signal* 2: ra36.

Scherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F. and Agid, Y. (1989) "Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging", *Ann Neurol* 26: 551-7.

Schmidt, C. J., Ritter, J. K., Sonsalla, P. K., Hanson, G. R. and Gibb, J. W. (1985) "Role of dopamine in the neurotoxic effects of methamphetamine", *J Pharmacol Exp Ther* 233: 539-44.

Schmitt, J. M. and Stork, P. J. (2002) "PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1", *Mol Cell* 9: 85-94.

Schober, A. (2004) "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP", *Cell Tissue Res* 318: 215-24.

Schwartz, R. K. and Huston, J. P. (1996) "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments", *Prog Neurobiol* 50: 275-331.

Sealfon, S. C. and Olanow, C. W. (2000) "Dopamine receptors: from structure to behavior", *Trends Neurosci* 23: S34-40.

Sengupta, A., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2006) "Regulation of phosphorylation of tau by protein kinases in rat brain", *Neurochem Res* 31: 1473-80.

Sgambato-Faure, V., Buggia, V., Gilbert, F., Levesque, D., Benabid, A. L. and Berger, F. (2005) "Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats", *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 936-47.

Sgambato, V., Pages, C., Rogard, M., Besson, M. J. and Caboche, J. (1998) "Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation", *J Neurosci* 18: 8814-25.

Sharma, P., Sharma, M., Amin, N. D., Albers, R. W. and Pant, H. C. (1999) "Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation", *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11156-60.

Shelton, S. B. and Johnson, G. V. (2004) "Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration", *J Neurochem* 88: 1313-26.

Sherer, T. B., Betarbet, R. and Greenamyre, J. T. (2001) "Pesticides and Parkinson's disease", *ScientificWorldJournal* 1: 207-8.

Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1994) "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia", *Ann Neurol* 36: 348-55.

Sidhu, A., Olde, B., Humblot, N., Kimura, K. and Gardner, N. (1999) "Regulation of human D1 dopamine receptor function and gene expression in SK-N-MC neuroblastoma cells", *Neuroscience* 91: 537-47.

Sidhu, A., Wersinger, C. and Vernier, P. (2004) "Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse?", *Faseb J* 18: 637-47.

Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E. and Bolam, J. P. (1998) "Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia", *Neuroscience* 86: 353-87.

Snow, B. J., Macdonald, L., McAuley, D. and Wallis, W. (2000) "The effect of amantadine on levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study", *Clin Neuropharmacol* 23: 82-5.

Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Huganir, R. L. and Greengard, P. (1998) "A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated

phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor", *J Neurosci* 18: 10297-303.

Society, M. D. (2002) "Movement disorder society based-review management of PD an evidence based review", *Movement disorder* 17: S1.

Song, Z. M., Undie, A. S., Koh, P. O., Fang, Y. Y., Zhang, L., Dracheva, S., Sealton, S. C. and Lidow, M. S. (2002) "D1 dopamine receptor regulation of microtubule-associated protein-2 phosphorylation in developing cerebral cortical neurons", *J Neurosci* 22: 6092-105.

Sotnikova T.D., Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. and Caron M.G. (2006)," Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter", *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5(1):45-56.

Spano, P. F., Govoni, S. and Trabucchi, M. (1978) "Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system", *Adv Biochem Psychopharmacol* 19: 155-65.

St-Hilaire, M., Landry, E., Levesque, D. and Rouillard, C. (2005) "Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism", *Neurobiol Dis* 20: 450-60.

Stamey, W., Davidson, A. and Jankovic, J. (2008) "Shoulder pain: a presenting symptom of Parkinson disease", *J Clin Rheumatol* 14: 253-4.

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Mulkearns, E. E., Shulman, J. M., Biernat, J., Mandelkow, E. M. and Feany, M. B. (2007) "S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*", *J Neurosci Res* 85: 1271-8.

Stockwell, K. A., Scheller, D., Rose, S., Jackson, M. J., Tayarani-Binazir, K., Iravani, M. M., Smith, L. A., Olanow, C. W. and Jenner, P. (2009) "Continuous administration of rotigotine to MPTP-treated common marmosets enhances anti-parkinsonian activity and reduces dyskinesia induction", *Exp Neurol* 219: 533-42.

Stoof, J. C., Booij, J., Drukarch, B. and Wolters, E. C. (1992) "The anti-parkinsonian drug amantadine inhibits the N-methyl-D-aspartic acid-evoked release of acetylcholine from rat neostriatum in a non-competitive way", *Eur J Pharmacol* 213: 439-43.

Stoothoff, W. H. and Johnson, G. V. (2005) "Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences", *Biochim Biophys Acta* 1739: 280-97.

Suchowersky, O., Reich, S., Perlmuter, J., Zesiewicz, T., Gronseth, G. and Weiner, W. J. (2006) "Practice Parameter: diagnosis and prognosis of new onset

Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology", *Neurology* 66: 968-75.

Sun, L., Wang, X., Liu, S., Wang, Q., Wang, J., Bennecib, M., Gong, C. X., Sengupta, A., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2005) "Bilateral injection of isoproterenol into hippocampus induces Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau and spatial memory deficit in rat", *FEBS Lett* 579: 251-8.

Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. and Greengard, P. (1995) "Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons", *Neuron* 14: 385-97.

Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z. and Shen, W. (2007) "D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons", *Trends Neurosci.* 30(5):228-35.

Surmeier, D.J., Guzman, J.N. and Sanchez-Padilla, J. (2010) "Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease.", *Cell Calcium.* 47(2):175-82.

Svenningsson, P., Fienberg, A. A., Allen, P. B., Moine, C. L., Lindskog, M., Fisone, G., Greengard, P. and Fredholm, B. B. (2000a) "Dopamine D(1) receptor-induced gene transcription is modulated by DARPP-32", *J Neurochem* 75: 248-57.

Svenningsson, P., Lindskog, M., Ledent, C., Parmentier, M., Greengard, P., Fredholm, B. B. and Fisone, G. (2000b) "Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors", *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1856-60.

Tanner, C. M., Ottman, R., Goldman, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R. and Langston, J. W. (1999) "Parkinson disease in twins: an etiologic study", *Jama* 281: 341-6.

Tian, Q., Zhang, J. X., Zhang, Y., Wu, F., Tang, Q., Wang, C., Shi, Z. Y., Zhang, J. H., Liu, S., Wang, Y., Zhang, Q. and Wang, J. Z. (2009) "Biphasic effects of forskolin on tau phosphorylation and spatial memory in rats", *J Alzheimers Dis* 17: 631-42.

Tong, J., Fitzmaurice, P. S., Ang, L. C., Furukawa, Y., Guttman, M. and Kish, S. J. (2004) "Brain dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy", *Ann Neurol* 55: 125-9.

Tsai, L.H., Lee, M.S, and Cruz, J., (2004). "Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?", *Biochimica and biophysica acta* 1697:137-142.

Ungerstedt, U. (1968) "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons", *Eur J Pharmacol* 5: 107-10.

Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G. and Wood, N. W. (2004) "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1", *Science* 304: 1158-60.

Vallone, D., Picetti, R. and Borrelli, E. (2000) "Structure and function of dopamine receptors", *Neurosci Biobehav Rev* 24: 125-32.

Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A. and Nelson, L. M. (2003) "Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity", *Am J Epidemiol* 157: 1015-22.

Van Tol, H. H., Bunzow, J. R., Guan, H. C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B. and Civelli, O. (1991) "Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine", *Nature* 350: 610-4.

Vila, M. and Przedborski, S. (2004) "Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease", *Nat Med* 10 Suppl: S58-62.

Vingerhoets, F. J., Schulzer, M., Calne, D. B. and Snow, B. J. (1997) "Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion?", *Ann Neurol* 41: 58-64.

Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S. and Stork, P. J. (1997) "cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway", *Cell* 89: 73-82.

Wang, J., Liu, S., Fu, Y., Wang, J. H. and Lu, Y. (2003) "Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors", *Nat Neurosci* 6: 1039-47.

Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2007) "Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration", *Eur J Neurosci* 25: 59-68.

Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., O'Dowd, B. F., Seeman, P. and Brann, M. R. (1991) "D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain", *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1859-63.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1975) "A protein factor essential for microtubule assembly", *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1858-62.

- Weissman, J. T., Ma, J. N., Essex, A., Gao, Y. and Burstein, E. S. (2004) "G-protein-coupled receptor-mediated activation of rap GTPases: characterization of a novel Galphai regulated pathway", *Oncogene* 23: 241-9.
- Wersinger, C., Chen, J. and Sidhu, A (2004) "Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autooxidation" *Mol Cell Neurosci.* 25(1):124-37.
- Westin, J. E., Vercammen, L., Strome, E. M., Konradi, C. and Cenci, M. A. (2007) "Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors", *Biol Psychiatry* 62: 800-10.
- Whone, A. L., Moore, R. Y., Piccini, P. P. and Brooks, D. J. (2003a) "Plasticity of the nigropallidal pathway in Parkinson's disease", *Ann Neurol* 53: 206-13.
- Whone, A. L., Watts, R. L., Stoessl, A. J., Davis, M., Reske, S., Nahmias, C., Lang, A. E., Rascol, O., Ribeiro, M. J., Remy, P., Poewe, W. H., Hauser, R. A. and Brooks, D. J. (2003b) "Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study", *Ann Neurol* 54: 93-101.
- Wichmann, T. and DeLong, M. R. (1996) "Functional and pathophysiological models of the basal ganglia", *Curr Opin Neurobiol* 6: 751-8.
- Wichmann, T. and DeLong, M. R. (2003) "Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease", *Adv Neurol* 91: 9-18.
- Winkler, C., Kirik, D., Bjorklund, A. and Cenci, M. A. (2002) "L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function", *Neurobiol Dis* 10: 165-86.
- Wood L.D. (2010) "Clinical review and treatment of select adverse effects of dopamine receptor agonists in Parkinson's disease." *Drugs Aging* 27(4):295-310.
- Xing, J., Ginty, D. D. and Greenberg, M. E. (1996) "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase", *Science* 273: 959-63.
- Yamada, M. and Yasuhara, H. (2004) "Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future", *Neurotoxicology* 25: 215-21.
- Yamamoto, N. and Soghomonian, J. (2009) "Metabotropic glutamate mGluR5 receptor blockade opposes abnormal involuntary movements and the increases in glutamic acid decarboxylase mRNA levels induced by L-DOPA in striatal neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats", *J.Neuroscience.* 163(4):1171-80.

Yazdani, U., German, D. C., Liang, C. L., Manzano, L., Sonsalla, P. K. and Zeevalk, G. D. (2006) "Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)", *Exp Neurol* 200: 172-83.

Youdim, M.B. (1975) "Monoamine oxydase. Its inhibition." *Mod. Probl Pharmacopsychiatry* 10:65-88.

Youdim, M. B., Edmondson, D. and Tipton, K. F. (2006) "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors", *Nat Rev Neurosci* 7: 295-309.

Yuan H, Zhang ZW, Liang LW, Shen Q, Wang XD, Ren SM, Ma HJ, Jiao SJ, Liu P. (2010) "Treatment strategies for Parkinson's disease" *Neurosci Bull.* 26(1):66-76.

Zachariou, V., Sgambato-Faure, V., Sasaki, T., Svenningsson, P., Berton, O., Fienberg, A. A., Nairn, A. C., Greengard, P. and Nestler, E. J. (2006) "Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action", *Neuropsychopharmacology* 31: 555-62.

Zhang, J., Price, J. O., Graham, D. G. and Montine, T. J. (1998) "Secondary excitotoxicity contributes to dopamine-induced apoptosis of dopaminergic neuronal cultures", *Biochem Biophys Res Commun* 248: 812-6.

Zhang, Y., Li, H. L., Wang, D. L., Liu, S. J. and Wang, J. Z. (2006) "A transitory activation of protein kinase-A induces a sustained tau hyperphosphorylation at multiple sites in N2a cells-implicates a new mechanism in Alzheimer pathology", *J Neural Transm* 113: 1487-97.

Zhen, X., Uryu, K., Wang, H. Y. and Friedman, E. (1998) "D1 dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells", *Mol Pharmacol* 54: 453-8.

Zhuang, X., Belluscio, L. and Hen, R. (2000) "G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling", *J Neurosci* 20: RC91.

Zigmond, M. J., Abercrombie, E. D., Berger, T. W., Grace, A. A. and Stricker, E. M. (1990) "Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications", *Trends Neurosci* 13: 290-6.

Zukerberg, L. R., Patrick, G. N., Nikolic, M., Humbert, S., Wu, C. L., Lanier, L. M., Gertler, F. B., Vidal, M., Van Etten, R. A. and Tsai, L. H. (2000) "Cdk5 links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth", *Neuron* 26: 633-46.